

# **Charakterisierung zirkulierender plasmacytoider dendritischer Zellen bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale**

Aus der medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Zentrum für Innere Medizin

Abteilung für Pneumologie und Interdisziplinäre Internistische Intensivtherapie

Direktor: Prof. Dr. med. J. Chr. Virchow, FRCP, FCCP, FAAAAI

Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der  
Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Christine Prieschenk

geb. am 11.10.1983 in Tirschenreuth

aus Regensburg

Rostock, 2013

Dekan Prof. Dr.med. Emil Christian Reisinger

**Dekan:** Prof. Dr.med. Emil Christian Reisinger

**Gutacher:**

1.Gutachter:

Prof. Dr. med. J. Christian Virchow, Zentrum für Innere Medizin, Abteilung  
für Pneumologie und Interdisziplinäre Internistische Intensivmedizin,  
Universität Rostock

2.Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Bernd Kreikemeyer, Institut für Medizinische  
Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universität Rostock

3.Gutachter:

Prof. Dr. med. Tobias Welte, Zentrum für Innere Medizin, Klinik für  
Pneumologie, Medizinische Hochschule Hannover

**Datum der Einreichung:** 05.November 2013

**Datum der Verteidigung:** 21.Juli 2015

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VI</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Asthma bronchiale</b>	<b>1</b>
1.1.1. Definition	1
1.1.2. Formen des Asthma bronchiale	2
1.1.3. Pathophysiologie des Asthma bronchiale	3
<b>1.2 Dendritische Zellen</b>	<b>4</b>
1.2.1 Plasmacytoide dendritische Zellen	7
1.2.2 Die Bedeutung der dendritischen Zellen in der Lunge	9
1.2.3 Dendritische Zellen und deren Rolle beim Asthma bronchiale	10
<b>1.3 Zielsetzung</b>	<b>12</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Material und Reagenzien</b>	<b>13</b>
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	13
2.1.2 Chemikalien und sonstige Reagenzien	14
2.1.3 Antikörper	16
<b>2.2 Puffer, Kulturmedien und Lösungen</b>	<b>17</b>
2.2.1 Durchflusszytometrie	17
2.2.2 Zellisolation und Zellkultur	17
2.2.3 Magnetische Zellseparation	18
2.2.4 Sandwich-ELISA	18
<b>2.3 Klinische Methoden</b>	<b>19</b>
2.3.1 Blutentnahme	19
2.3.2 Spirometrie	19
2.3.3 Bestimmung der Gesamt-IgE-Konzentration und spezifischer IgE-Antikörper	20
<b>2.4 Isolierung, Differenzierung und Kultivierung von Zellen</b>	<b>21</b>
2.4.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut	21
2.4.2 Zellzahlbestimmung	22
2.4.3 Immunmagnetische Separation der pDCs	23
2.4.4 Kultivierung der pDCs	

<b>2.5 Durchflusszytometrie</b>	<b>23</b>
2.5.1 Markierung von Oberflächenantigenen auf Vollblutleukozyten	24
2.5.2 Markierung intrazellulärer Antigene in Vollblutleukozyten	26
<b>2.6 Enzymimmunoassays</b>	<b>26</b>
2.6.1 Quantitative Bestimmung von IL-6, TNF- $\alpha$ und IFN- $\alpha$ mittels Sandwich-ELISA	26
<b>2.7 Probanden</b>	<b>27</b>
<b>2.8. Statistik</b>	<b>29</b>
<b>3 RESULTATE</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Identifizierung der pDCs im peripheren Blut von Patienten mit Asthma und Normalpersonen</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf pDCs</b>	<b>31</b>
3.2.1 Expression der costimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD83, CD86 und OX40L	31
3.2.2 Expression der IgG-Rezeptoren CD32 und CD64 und der IgE-Rezeptoren CD23 und Fc $\epsilon$ RI $\alpha$	32
3.2.3 Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a, CD11b, CD18, CD54 und CD62L	34
3.2.4 Expression von Chemokinrezeptoren	35
3.2.5 Expression von TLR9	39
<b>3.3 Auswirkung einer saisonalen Behandlung mit inhalativen Kortikosteroiden auf pDCs</b>	<b>40</b>
3.3.1 Expression von OX40L und CD54 in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung mit inhalativen Kortikosteroiden	41
3.3.2 IL-6-, TNF- $\alpha$ - und IFN- $\alpha$ -Freisetzung nach Stimulation mit einem TLR9-Agonisten	42
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Phänotypische Veränderungen der pDCs im TH2-Milieu von Patienten mit Asthma</b>	<b>44</b>
4.1.1 PDCs von Patienten mit Asthma befinden sich auf einem höheren Aktivierungsniveau	44
4.1.2 Die vermehrte Expression von Immunglobulinrezeptoren spiegelt das Th2-induzierende Potenzial der pDCs wider	46
4.1.3 TLR9	47
4.1.4 Adhäsionsmoleküle: PDCs exprimieren CD11a, CD18 und CD62L	48
4.1.5 PDCs von Patienten mit Asthma sind mit Chemokinrezeptoren ausgestattet die eine Migration in entzündetes Gewebe ermöglichen	49

## Inhaltsverzeichnis

<b>4.2 Mögliche Langzeiteffekte von inhalativen Glukokortikoiden auf pDCs im Blut</b>	<b>52</b>
4.2.1 Antiinflammatorische Effekte durch Suppression von OX40L und CD54	52
4.2.2 Reduktion der TLR9-vermittelten Zytokinsekretion	53
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>55</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>57</b>
<b>PUBLIKATION</b>	<b>65</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>66</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>67</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>68</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb 1.1.1	Histologisches Bild einer Schleimhautbiopsie eines Patienten mit Asthma	2
Abb 1.2.1	Lebenszyklus der DC	7
Abb 1.2.2	Morphologie von pDCs	9
Abb 3.1.1	Strategie zur Identifikation der pDCs aus dem Vollblut von Patienten mit Asthma und Normalpersonen	30
Abb 3.1.2	Prozentualer Anteil der pDCs im Vollblut	31
Abb 3.2.1	Exemplarische Darstellung der Expression der costimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD83 und CD86	31
Abb 3.2.2	Expression der costimulatorischen Moleküle CD40 und CD86	32
Abb 3.2.3	Exemplarische Darstellung der Expression der Immunglobulinrezeptoren CD32, CD64, CD23 und FcεRIα	33
Abb 3.2.4	Expression der Immunglobulinrezeptoren CD32, CD64, und FcεRIα	33
Abb 3.2.5	Exemplarische Darstellung der Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a, CD11b, CD18 und CD62L	34
Abb 3.2.6	Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a, CD18 und CD62L	35
Abb 3.2.7	Exemplarische Darstellung der Expression der Chemokinrezeptoren CCR1 – 10	36
Abb 3.2.8	Exemplarische Darstellung der Chemokinrezeptoren CXCR1 – 7	37
Abb 3.2.9	Expression der Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, CCR9 und CCR10	38
Abb 3.2.10	Expression der Chemokinrezeptoren CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6 und CXCR7	39
Abb 3.2.11	Expression von TLR9 in pDCs	40
Abb 3.3.1	Exemplarische Darstellung der Expression von CD54 und OX40L	41
Abb 3.3.2	Expression von OX40L und CD54	42
Abb 3.3.3	Freisetzung von IL-6, TNF-α und IFN-α nach Stimulation mit dem TLR9-Agonisten ODN2216	43
Abb 4.1.1	Phänotypische Veränderungen der pDCs im Th2-Milieu der Patienten mit Asthma	51
Abb 4.2.1	Mögliche Langzeiteffekte von inhalativen Kortikosteroiden auf pDCs	54

## Tabellenverzeichnis

Tab 2.1.1	Antikörper zur Identifikation der pDCs	16
Tab 2.1.2	Antikörper zur Färbung der zu untersuchenden Antigene auf pDCs	16
Tab 2.1.3	Antikörper zur Färbung der Chemokinrezeptoren auf pDCs	17
Tab 2.5.1	Fluorochrome	23
Tab 2.5.2	Ansätze 1-13 zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Oberflächenantigenen auf pDCs	24
Tab 2.5.3	Ansätze 14-29 zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Chemokinrezeptoren auf pDCs	25
Tab 2.5.4	Ansätze 30-35 zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Oberflächenantigenen auf pDCs	25
Tab 2.5.5	Ansätze zur durchflusszytometrischen Bestimmung der intrazellulären Expression von TLR9 in pDCs	26
Tab 2.7.1	Patientencharakteristika	28

## Abkürzungsverzeichnis

A	Patienten mit Asthma
APC	Allophycocyanin
AutoMACS	<i>Automatic magnetic cell separation</i>
BA	Beta-Sympathomimetika
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BDCA	<i>Blood dendritic cell antigene</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CS	Kortikosteroide
CXCL	CXC-Chemokin-Ligand
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
DC	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell scan</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FEV <sub>1</sub>	Forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunden
HLA	<i>Human leukocyte antigene</i>
HPE-Puffer	<i>High performance ELISA-Puffer</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICS	Inhalative Kortikosteroide
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin



## Abkürzungsverzeichnis

KCL	Kaliumchlorid
lin	<i>Lineage</i>
m	Männlich
mDC	<i>Myeloid dendritic cell</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NP	Normalperson
OAH	Orale Antihistaminika
ODN	Oligodesoxynukleotid
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pDC	<i>Plasmacytoid dendritic cell</i>
PE	Phycoerythrin
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PerCP	Perinidin-Chlorophyll-A Protein
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SSC	<i>Sideward scatter</i>
Th	T-Helfer-Zellen
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
w	Weiblich
w/v	Gewicht/Volumen-Prozent
VC	Vitalkapazität
v/v	Volumen/Volumen-Prozent

# **1. Einleitung**

## **1.1. Asthma bronchiale**

In Deutschland leiden etwa fünf Prozent der Erwachsenen und bis zu zehn Prozent der Kinder an einem Asthma bronchiale (Stock S 2005). Durch die hohe Prävalenz der Erkrankung entsteht für die Bundesrepublik Deutschland ein enormer volkswirtschaftlicher Schaden. In einer Krankheitskosten-Analyse aus dem Jahr 1996 wurde ein Gesamtbetrag von über 2,5 Milliarden Euro errechnet, der durch die Erkrankung Asthma bronchiale verursacht wird (Nowak D 1996). Ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen dieser Erkrankung ist deshalb, und auch im Hinblick auf die Entwicklung kurativer Therapiestrategien oder präventiver Maßnahmen wünschenswert. Seit einigen Jahren wird den dendritischen Zellen eine entscheidende Rolle beim Asthma bronchiale zugeschrieben. In dieser Arbeit wurde deshalb versucht, die Unterschiede herauszuarbeiten, die zwischen dendritischen Zellen von gesunden Probanden und Patienten mit Asthma bestehen.

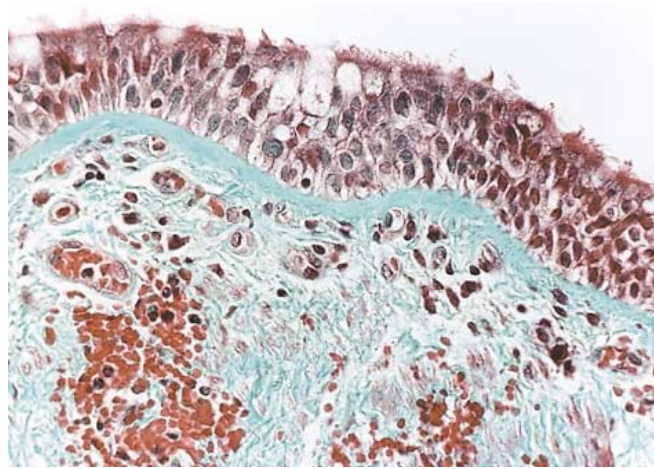
### **1.1.1 Definition**

Asthma bronchiale ist durch eine anfallartig auftretende Luftnot gekennzeichnet, die häufig von Husten, einem Engegefühl in der Brust und einem pfeifenden Atemgeräusch begleitet ist. Verursacht wird die akute Dyspnoe durch eine bronchiale Obstruktion, die durch eine Kontraktion der glatten Muskulatur in den Bronchialwänden, eine Hypersekretion der schleimproduzierenden Zellen im Bronchialepithel und ein Schleimhautödem verursacht wird (Herxheimer Trias). Bei der klinischen Untersuchung findet man im akuten Asthmaanfall bei der Auskultation der Lunge ein Giemen oder Brummen sowie ein verlängertes Expirium. Lungenfunktionell spiegelt sich die bronchiale Obstruktion durch einen verminderten FEV<sub>1</sub>-Wert und einen erniedrigten Tiffeneau-Index (FEV<sub>1</sub> /VC) wieder. Typischerweise ist die Obstruktion beim Asthma bronchiale im symptomfreien Intervall komplett reversibel (Buhl R 2006).

Pathophysiologisch liegt der Erkrankung eine chronische, in ihrer Ausprägung wechselnde Entzündung der Atemwege zu Grunde, die zu einer bronchialen Hyperreagibilität führt. Durch die Überempfindlichkeit des Bronchialsystems kann es dann auch zur Auslösung von Asthmaanfällen durch unspezifische Reize kommen. Im klinischen Alltag wird die bronchiale Hyperreagibilität mit Hilfe von Provokationstests

## Einleitung

nachgewiesen, wobei der Patient beispielsweise steigende Dosen von Methacholin inhaliert. Auf Grund der chronischen Entzündung in den Atemwegen entstehen strukturelle Veränderungen im Bereich der Bronchialwände. Die Schleimhautbiopsie eines Asthmatikers zeigt charakteristische histologische Veränderung (Abb 1.1.1). Im Bronchialepithel findet man eine Becherzellhyperplasie als morphologisches Korrelat der oben beschriebenen Dyskrinie. Durch Ablagerung von Kollagenen kommt es zur Verbreiterung der Basalmembran und in der Submukosa findet man eine vorwiegend eosinophile Infiltration (Busse WW 2001).



**Abb 1.1.1 Histologisches Bild einer Schleimhautbiopsie eines Patienten mit Asthma aus Asthma von Busse W. 2001;** Deutlich erkennbar ist die Verdickung der Basalmembran als Zeichen einer vermehrten Kollagenablagerung und die zelluläre Infiltration. Angedeutet zeigt sich eine Becherzellhyperplasie des Bronchialepithels.

### 1.1.2. Formen des Asthma bronchiale

Grundsätzlich können beim Asthma bronchiale abhängig vom auslösenden Reiz eine exogen-allergische und eine nichtallergische Form unterschieden werden (Buhl R 2006). Beim exogen-allergischen Asthma bronchiale bildet der Patient spezifische IgE-Antikörper gegen Aeroallergene wie zum Beispiel Pollen, Tierhaare, Schimmelsporen oder Hausstaubmilben. Typischerweise findet man beim atopischen Asthma im Blut eine Eosinophilie und erhöhte Konzentration des Gesamt-IgE. Der Nachweis des spezifischen IgE-Antikörpers im Blut und eine positive Reaktion im Prick-Test sprechen für die Sensibilisierung gegen ein verdächtiges Allergen. Das exogen-allergische Asthma bronchiale ist häufig mit anderen atopischen Erkrankungen wie der atopischen

Dermatitis oder einer allergischen Rhinitis assoziiert und die Familienanamnese der betroffenen Patienten ist meist positiv für Allergien (Virchow JC 1996).

Unter dem Begriff intrinsisches oder nichtallergisches Asthma bronchiale fasst man dagegen alle Formen einer asthmatischen Erkrankung zusammen, die nicht durch den Kontakt mit einem Allergen ausgelöst werden. Typische Faktoren, die beim nichtallergischen Asthma einen Asthmaanfall auslösen können, sind unspezifische Reize wie Kälte, pulmonale Infekte, körperliche Belastung oder gastroösophagealer Reflux. Da es sich beim intrinsischen Asthma nicht um eine Allergie im klassischen Sinn handelt, ist die Konzentration des Gesamt-IgEs im Blut nicht erhöht. Spezifische IgE-Antikörper können definitionsgemäß nicht nachgewiesen werden und auch im Prick-Test zeigt sich keine positive Reaktion auf ein spezifisches Allergen (Virchow JC 1996). Eine Sonderform stellt das Analgetika-induzierte Asthma dar, wobei es durch die Einnahme von Aspirin oder anderer nichtsteroidaler Antirheumatika zur Verschlechterung eines bereits bestehenden Asthmas bis hin zum Status asthmaticus kommen kann.

Häufig entwickelt sich im Verlauf eine Mischform aus einem exogen-allergischen und einem intrinsischen Asthma bronchiale. Es besteht sowohl die Möglichkeit, dass ausgehend von einem nichtallergischem Asthma bronchiale eine allergische Komponente dazukommt, als auch umgekehrt (Buhl R 2006).

### **1.1.3 Pathophysiologie des Asthma bronchiale**

Nach heutigem Verständnis wird die Entzündung beim Asthma bronchiale durch T-Helfer-2-Zellen (Th2) vermittelt, die unter anderem IL-4, IL-5 und IL-13 sezernieren (Lambrecht N 2003). Unter physiologischen Bedingungen dient die Th2-Immunantwort zur Abwehr parasitärer Infektionen (van Rijt LS 2005). Beim Asthma bronchiale führt aber eine unphysiologische Th2-Reaktion zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Bronchialepithel und zur Sekretion von Chemokinen, wodurch die für das Asthma bronchiale typische chronische Entzündung unterhalten wird (Lambrecht N. 2003). Beim exogen-allergischen Asthma bronchiale besteht eine Sensibilisierung gegen ein oder mehrere spezifische Antigene, die unter physiologischen Bedingungen für den Organismus ungefährlich sind. Im Rahmen der Sensibilisierung kommt es zur Synthese von spezifischen IgE-Antikörpern durch B-Zellen, welche dann ins Plasma abgegeben werden. Ein kleiner Teil der IgE-Moleküle verbleibt ungebunden im Plasma und der andere, größere Teil der IgE-Moleküle bindet über IgE-Rezeptoren

an die Oberfläche von Immunzellen. Dringt das spezifische Antigen in die Lunge ein, kommt es zur Kreuzvernetzung der gebundenen IgE-Moleküle auf der Oberfläche von Mastzellen. Dadurch werden verschiedene Signalkaskaden in der Mastzelle aktiviert, die zur Freisetzung von Mediatorstoffen wie Histamin, Prostaglandinen und Leukotrienen führen. Innerhalb weniger Minuten entsteht eine bronchiale Obstruktion (Lane SJ 1996, Dullaers M 2012). Diese unmittelbare Reaktion, die durch die Freisetzung präformierter Mediatoren ausgelöst wird, bezeichnet man als Mast-Zell-vermittelte Sofortreaktion. Nachdem die akute Reaktion spontan durch Abbau der Mediatoren oder medikamentös beendet wurde, kann sich etwa sechs bis zwölf Stunden nach Allergenkontakt eine asthmatische Spätreaktion entwickeln (O'Byrne PM 1987). Mit Hilfe von dendritischen Zellen wird das inhalierte Antigen zu den regionären Lymphknoten gebracht und dort spezifischen Immunzellen präsentiert, die dann wiederum an den Ort der allergischen Entzündung auswandern. Durch die Freisetzung von Mediatoren aus den neu eingewanderten Immunzellen wird eine erneute bronchiale Obstruktion ausgelöst (Jahnsen FL 2001, Upham JW 2002).

Auch beim intrinsischen Asthma bronchiale wird der akute Asthmaanfall durch die Degranulation der Mastzellen ausgelöst (Anderson SD 2010). Der Unterschied zum exogen-allergischen Asthma besteht darin, dass die Freisetzung der bronchokonstriktorisches Mediatoren nicht durch spezifische Antikörper vermittelt wird und eine asthmatische Spätreaktion ausbleibt. Der genaue Mechanismus, welcher beim intrinsischen Asthma bronchiale zur Degranulation führt, ist nicht im Detail bekannt.

## 1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen wurden zum ersten Mal 1868 von Paul Langerhans in der Basalschicht der Epidermis beschrieben. Auf Grund ihrer Morphologie ordnete man sie damals den Neuronen zu (Vermaelen K & Pauwels R 2004). Anschließend dauerte es über hundert Jahre bis die dendritische Zelle korrekterweise in die Gruppe der Leukozyten eingeordnet werden konnte. Die eigentliche Charakterisierung der dendritischen Zelle als Teil des Immunsystems begann erst vor etwa 40 Jahren durch eine Arbeitsgruppe um Ralph Steinman (Steinman RM 1973). Heute schreibt man den dendritischen Zellen eine wichtige Rolle als Initiatoren und Modulatoren der Immunantwort zu. Sie agieren als Antigen-präsentierende Zellen und besitzen die

## Einleitung

einzigartige Fähigkeit eine primäre Immunantwort zu induzieren (Banchereau J 1998). Darüberhinaus wird ihnen auch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz gegenüber dem eigenen Organismus zugeschrieben (Steinmann RM 2003).

Dendritische Zellen sind in nahezu jedem Organ nachweisbar (Vermaelen K 2005). Sie werden im Knochenmark gebildet und gelangen dann über den Blutstrom in einer unreifen oder nichtaktivierten Form in die peripheren Gewebe (Banchereau J 2000). Ihren Weg bahnen sich DCs mit Hilfe von Chemokingradienten und den dazugehörigen Chemokinrezeptoren. CCR9 ist beispielsweise der Rezeptor für das darmassoziierte Chemokin CCL25 und CCR10 vermittelt Chemotaxis entlang eines CCL27-Gradienten in die Haut (Ueno 2007). Um eindringende Pathogene aufspüren zu können, sind die unreifen DCs mit Mustererkennungsrezeptoren wie z.B. Toll-like Rezeptoren oder C-type-lectin Rezeptoren ausgestattet und verfügen über eine hohe phagozytotische Kapazität. Gleichzeitig sind die antigenpräsentierenden Moleküle (MHC, CD1a) und die costimulatorischen Moleküle, die zur Aktivierung der T-Zellen notwendig sind, in nur sehr geringem Ausmaß auf der Zelloberfläche einer unreifen dendritischen Zelle exprimiert (Banchereau J 1998).

Kommt eine dendritische Zelle mit einem Antigen in Kontakt, wird dieses von der Zelle internalisiert und im Cytoplasma zu Antigenfragmenten verarbeitet, die dann mit Hilfe von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Dendritische Zellen stellen somit die professionellen Antigen-präsentierenden Zellen des Körpers dar. Gleichzeitig führt die Interaktion mit einem Pathogen zur Aktivierung und Reifung der dendritischen Zelle. Die Zelle erlangt die Fähigkeit aus dem infizierten Gewebe in die regionären Lymphknoten auszuwandern. Durch die Stimulation von Toll-like Rezeptoren entsteht eine verstärkte Expression von CCR7, wodurch das Auswandern der DCs über die hochendothelialen Venulen entlang eines CCL19- und CCL21-Gradienten in die Lymphknoten vermittelt wird (Seth S 2001, Vermaelen K 2005). Zum anderen werden vermehrt costimulatorische Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert, die zur Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen nötig sind (Banchereau J 2000). Zu den costimulatorischen Molekülen gehören unter anderem CD40, CD80, CD83, CD86 und OX40L. CD40 wird von inaktivierten DCs in einem geringeren Ausmaß exprimiert (Ma DY 2009). Eine Bindung von CD40 zu seinem Liganden auf T-Helfer-Zellen führt zu einem verlängertem Überleben und zur vermehrten Expression von CD80 und CD86 auf der DC (Banchereau J 1998). CD80 und CD86 können ihrerseits über

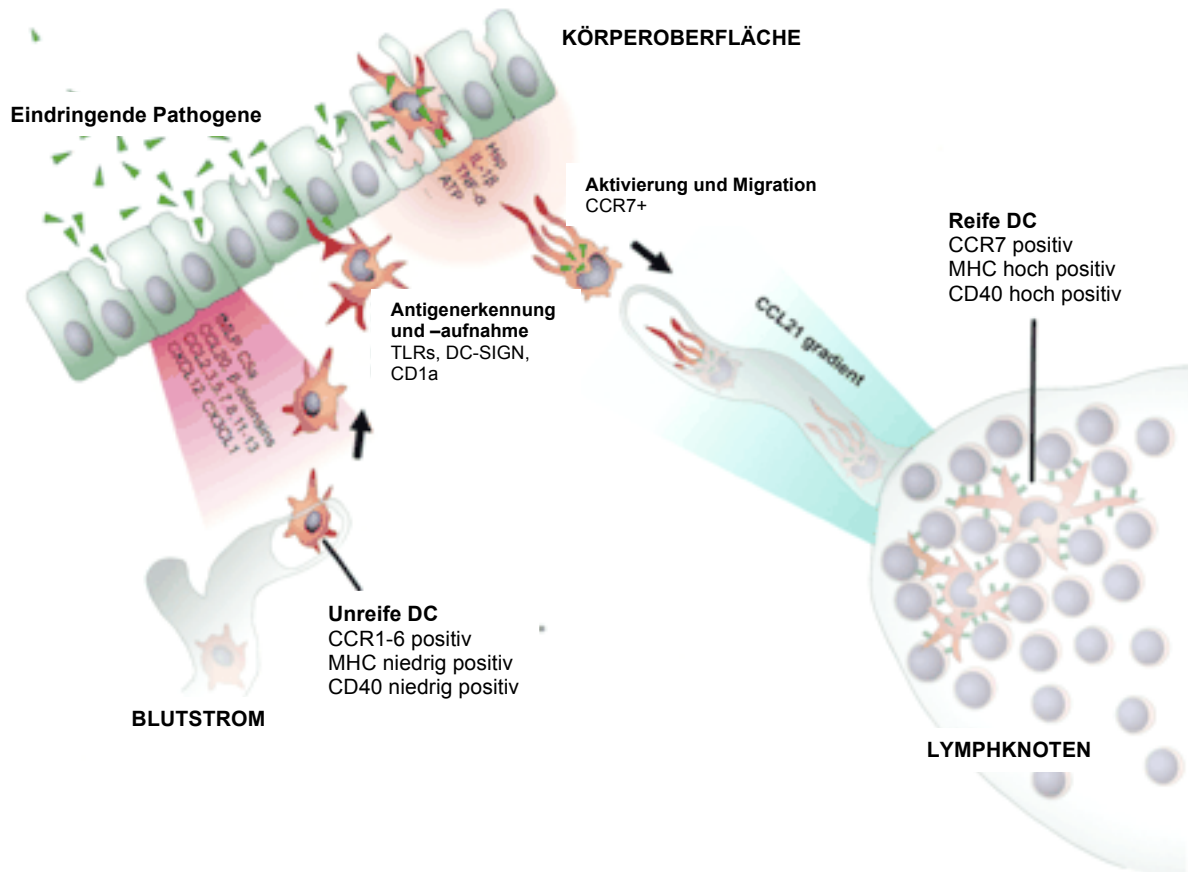
## Einleitung

CD28 an T-Helfer-Zellen binden und fördern damit die Umwandlung der T-Helferzelle in eine Effektorzelle (Ueno H 2007) (Abb 1.2.1).

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion kommt es auch immer zum Untergang körpereigenen Gewebes mit der Gefahr, dass autologe Antigene von den DCs aufgenommen werden und eine Autoimmunreaktion ausgelöst wird. Um dies zu verhindern nehmen die DCs auch unter steady-state Bedingungen Zellfragmente des normal stattfindenden Zell-Turnovers auf, transportieren die Information in die T-Zell-Zone der Lymphknoten und induzieren dann immunsuppressive regulatorische T-Zellen. (Hawiger D. 2001)

Welche T-Zell-Antwort initiiert wird hängt vom Typ und vom Aktivierungsgrad der dendritischen Zelle (Pulendran B 1999), von der Art und der Menge des Antigens und von begleitenden Umgebungsfaktoren (Vieira PL 2000) ab. Die reguläre Antwort, die nach dem Aufspüren von Viren oder Bakterien durch DCs hervorgerufen wird, ist eine Th1-Antwort, die durch die Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  durch die T-Zelle charakterisiert ist. Das Eindringen von extrazellulären Parasiten führt gewöhnlich zu einer Th2-Antwort, wodurch es zur Freisetzung von IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 sowie zur Produktion von IgE und zur Einwanderung von Eosinophilen und Mastzellen kommt. Zusätzlich zur Einleitung einer abwehrenden Immunantwort sind die DCs, die unter stabilen Bedingungen, also ohne inflammatorischen Stimulus in die regionären Lymphknoten auswandern, in der Lage, regulatorische T-Zellen zu induzieren (Hawiger D 2001; Roncarolo MG 2001; Vermaelen K 2005).

Wie bereits oben erwähnt, kann die Gruppe der dendritischen Zellen weiter unterteilt werden: Es wird unterschieden zwischen plasmacytoiden dendritischen Zellen, die große Mengen IFN- $\alpha$  freisetzen können und myeloiden oder konventionellen dendritische Zellen. In den letzten Jahren wurden weitere Subtypen identifiziert, z.B. die CD1a<sup>+</sup>DC, die aber im weitesten Sinn unter einer der beiden Klassifikationen zusammengefasst werden können (Ueno H 2007). In dieser Arbeit wurden ausschließlich plasmacytoide dendritische Zellen untersucht, weshalb auf eine ausführliche Beschreibung der myeloiden dendritischen Zellen verzichtet wird.



**Abb 1.2.1: Lebenszyklus der DC aus Pulmonary Dendritic Cells, K Vermaelen et R. Pauwels 2004;** Unreife DC's werden im Knochenmark gebildet und gelangen über den Blutstrom in die Zielorgane. In der Lunge kontrollieren sie, ob über die Bronchialepithelien Pathogene in den Körper eindringen. Treffen die DCs auf ein Pathogen, kommt es zur Aktivierung und Auswanderung der DC in die regionären Lymphknoten, um dann eine zelluläre Immunantwort zu initiieren.

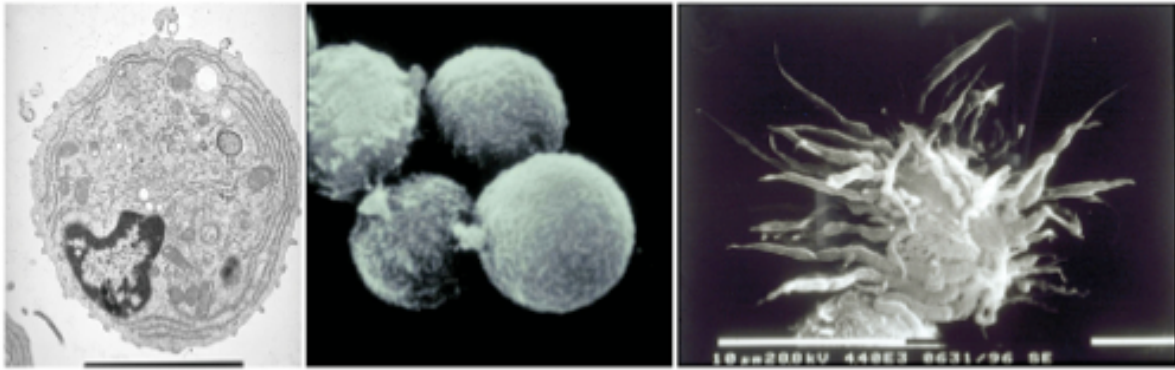
## 1.2.1 Plasmacytoide dendritische Zellen

Ihren Namen erhielten die plasmacytoiden dendritischen Zellen auf Grund ihrer Morphologie, die der von Plasmazellen ähnelt. Sie verfügen über ein gut entwickeltes raues endoplasmatisches Reticulum und einen runden bis ovalen Zellkern, der meist exzentrisch liegt (Abb 1.2.2). Im peripheren Blut machen die pDCs 0,01 - 0,05% der mononukleären Zellen aus (Jegalian AG 2009). Identifiziert werden können die pDCs über eine starke Expression des IL-3-Rezeptors CD123 und HLA-DR, sowie der fehlenden Expression der sogenannten lineage-Marker (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 und CD56) (Matsuda H 2002). Plasmacytoide dendritische Zellen können bereits in der fetalen Milz, Leber und dem Knochenmark nachgewiesen werden, weshalb man davon ausgeht, dass pDCs aus hämatopoetischen Stammzellen der primären Lymphorgane



## Einleitung

hervorgehen (Blom B. 2000). Ob sich pDCs aus einer myeloiden oder einer lymphatischen Vorläuferzelle entwickeln, ist bislang noch nicht geklärt. Ein wichtiger Faktor für die Entwicklung sowohl von pDCs als auch von mDCs ist Flt3L (fms-like tyrosinase kinase 3 ligand). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Konzentration der pDCs und mDCs im lymphatischen Gewebe und im peripheren Blut nach Injektion von Flt3L deutlich erhöht ist (Marakovsky E 1996). PDCs unterscheiden sich unter anderem durch die Expression der PRRs (pathogen recognition receptors) von mDCs. So wird TLR9 beispielsweise nur von pDCs und nicht von mDCs exprimiert (Kadowaki N 2001; Jarrossay D 2001). Treten pDCs in Kontakt mit Bakterien oder Viren, kommt es TLR7- und TLR9-vermittelt zur Sekretion großer Mengen  $\text{INF-}\alpha$  (Lund J 2003, Lund JM 2004). Sie initiieren dadurch eine potente angeborene antivirale Immunantwort, welche die virale Replikation eindämmen soll. Zeitgleich beginnt ein Reifungsprozess, der es ihnen dann ermöglicht, die erworbene Immunantwort zu starten (Kadowaki N 2000, Siegal FP 1999). Man geht davon aus, dass pDCs, die durch das Erkennen viraler oder bakterieller Bestandteile über Toll-like Rezeptoren oder durch Stimulation des CD40-Liganden aktiviert wurden, eine  $\text{INF}\alpha/\beta$ -vermittelte Th1-Immunantwort auslösen (Cella M 2000). PDCs, die durch IL-3 stimuliert werden, können aber auch über einen OX40L-abhängigen Mechanismus zur Differenzierung von Th2-Zellen aus naiven  $\text{CD4}^+$  T-Zellen führen (Ito T 2004). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Auslösung einer Th2- oder Th1-Immunantwort durch pDCs abhängig von der Antigen dosis, dem Aktivierungsgrad der DCs und den Umgebungsfaktoren ist (Boonstra A 2003). Neben der Induktion von Th1- und Th2-Zellen sind pDCs, die durch CpG-Oligodesoxynukleotide oder Viren stimuliert werden, auch in der Lage sind  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  regulatorische T-Zellen (Tregs) zu generieren (Moseman EA 2004, Kawamura K 2006). Speziell  $\text{CCR9}^+$  pDCs sind potente Induktoren von Tregs, die eine antigenspezifische Immunantworten sowohl in vitro als auch in vivo unterdrücken können. Nachdem pDCs über einen TLR aktiviert werden, kommt es rasch zur verminderten Expression von CCR9 (Hadeiba H 2008)



**Abb 1.2.2 Morphologie von pDCs aus Plasmacytoid dendritic cells in Immunity; Colonna M 2004;** In der elektronenmikroskopischen Darstellung erscheinen die pDCs wie Lymphoblasten mit einem gekerbten, runden bis ovalen Kern und einem gut entwickeltem rauhen endoplasmatischen Retikulum. In der gescannten Elektronenmikroskopie erscheinen die ruhenden unreifen pDCs kugelförmig. pDCs die durch CD40L aktiviert wurden, haben dagegen dendritische Zellmorphologie.

### 1.2.2 Die Bedeutung der dendritischen Zelle in der Lunge

Dendritische Zellen sind in der Lunge, im Lungenparenchym, in den Bronchialepithelien und in der viszerale Pleura nachweisbar (Sertl K 1986) und auch in der BAL konnten sowohl mDCs als auch pDCs identifiziert werden (Donnenberg VS 2003). Sie exprimieren T-Zell-costimulatorische Moleküle nur in geringem Ausmaß, die Fähigkeit Antigen aufzunehmen ist dagegen stark ausgeprägt (Cochand L 1999). Auch unter steady-state Bedingungen, wenn kein Hinweis für eine Entzündung in der Lunge zu finden ist, werden DCs aus dem Blutstrom in die Lunge rekrutiert (Vermaelen KY 2001; Holt PG 1994). Es sind verschiedene Chemokinrezeptoren bekannt, die Immunzellen entlang eines Chemokingradienten in die Lunge locken. So scheint beispielsweise CXCR6 eine wichtige Wegweiserfunktion zu haben, denn das zugehörige Chemokin CXCL16 wird von Alveolarmakrophagen sezerniert (Morgan AJ2005). Auch die Chemokine CCL3 und CCL5 werden in der Lunge gebildet und stellen die Liganden für die Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 dar (Vermaelen KY 2005). Gleichzeitig findet auch eine kontinuierliche Migration der DCs aus der Lunge in die regionären Lymphknoten statt, wodurch ein ständiger Informationsfluss bezüglich der vorhandenen Antigene aus der Lunge zu den T-Zellen in den Lymphknoten erfolgt (Vermaelen KY 2001). Gelangen inflammatorische Stimuli wie z.B. Bakterien oder virale Partikel in die Lunge, resultiert daraus eine sehr schnelle Einwanderung von DCs in die Lunge, die, so konnte im Tiermodell gezeigt werden, teilweise sogar schneller vonstatten geht als die Einwanderung neutrophiler Granulozyten (Mc William AS 1994). Nachdem die Entzündung in der Lunge überstanden ist, geht die Zahl der pulmonalen DCs wieder

zurück. Das Erreichen des steady-state Gleichgewichts wird aber teilweise, z.B. nach einer Infektion mit dem Respiratory Syncytial Virus, erst Wochen nach überstandener Infektion erreicht (Beyer M 2004). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die pulmonalen DCs in der Lage sind Antigen aufzunehmen ohne die Basalmembran zu beschädigen und das obwohl sie sich größtenteils in der Submukosa befinden (Vermaelen KY 2001). Ähnliches wurde auch für DCs an anderen Grenzflächen wie zum Beispiel in der Mukosa des Darms nachgewiesen. DCs sind also in der Lage kontinuierlich Informationen über die Zusammensetzung der Antigene auf den Körperoberflächen und damit der unmittelbaren Umgebung des Organismus an das Immunsystem weiterzuleiten.

### **1.2.3 Dendritische Zellen und deren Rolle beim Asthma bronchiale**

Welche Rolle die Dendritischen Zellen beim Asthma bronchiale spielen, ist bislang unklar. Es gibt aber Arbeiten, die bei Patienten mit Asthma eine vermehrte Anzahl pDCs im Blut (Matsuda H 2002) und auch in der Lunge nach Allergenkontakt beschreiben. Im Mausmodell wird die Auswanderung Antigen-tragender, pulmonaler dendritischer Zellen in die regionären Lymphknoten im Rahmen einer beginnenden allergischen Entzündung enorm gesteigert (Vermaelen K 2003). Bei Mäusen mit einem experimentell erzeugtem Asthma bronchiale werden vermehrt mDCs in der Bronchialschleimhaut und der BAL nachgewiesen. Verglichen mit Wildtyp-Mäusen befanden sich die DCs der asthmatischen Mäuse in einem reiferen Stadium. (Vermaelen K & Pauwels R). Außerdem konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass durch das Einbringen von Antigen-beladenen DCs eine Sensibilisierung gegen das eingebrachte Antigen erzeugt wird (Lambrecht BN 2000) und umgekehrt bleiben die klinischen Symptome durch die selektive Elimination der DCs während einer beginnenden allergischen Entzündung aus (Lambrecht BN 1998). Dagegen entwickeln Mäuse, bei denen ausschließlich pDCs depletiert wurden, nach Inhalation von eigentlich inerten Antigenen eine asthmatische Entzündung. Durch den Transfer von in vitro gezüchteten pDCs in die depletierten Mäuse kann die Entwicklung der bronchialen Hyperreagibilität wieder rückgängig gemacht werden. ( deHeer HJ 2004; Kool M 2009)

Beim Menschen kommt es nach einer Allergenprovokation zu einem Abfall der mDC-Population im peripheren Blut (Upham JW 2002, Farrell E 2007) und einem Anstieg sowohl der pDCs als auch der mDCs in der Flüssigkeit der bronchoalveolären Lavage. (Jahnsen FL 2001, Bratke K 2007). In Biopsien von Patienten mit Asthma bronchiale ist

## Einleitung

die Zahl der intraepithelialen DCs erhöht im Vergleich zu gesunden Personen. Werden die Patienten mit inhalativen Glukokortikoiden behandelt, geht die Zahl der intraepithelialen DCs wieder auf das Normalniveau zurück (Moller GM 1996). In vitro konnte gezeigt werden, dass DCs von Atopikern, die mit Allergenen der Hausstaubmilbe inkubiert wurden, zur Aktivierung von Th2 führen, wohingegen DCs von gesunden Probanden keine T-Zell-Antwort bzw. die Entwicklung regulatorischer T-Zellen induzierten. (Charbonnier AS 2003)

### 1.3 Zielsetzung

Einem allergisch bedingtem Asthma bronchiale liegt eine chronische Entzündung der Atemwege zu Grunde. Wie bei anderen atopischen Erkrankungen auch wird die allergische Reaktion beim Asthma durch Th2-Zellen vermittelt und es herrscht ein Th2-Zytokinmilieu vor. Plasmacytoide dendritische Zellen können in der allergisch entzündeten Lunge in einer erhöhten Konzentration nachgewiesen werden, weshalb ihnen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des Asthma bronchiales zugeschrieben wird. Ihre genaue Aufgabe ist bislang jedoch nicht bekannt.

Bei in vitro Untersuchungen konnte gezeigt werden dass die Inkubation von pDCs in einem Th2-Milieu zu deutlichen Veränderungen führt. Um den Einfluss, des bei Patienten mit Asthma vorherrschenden Th2-Milieus auf pDCs in vivo zu beurteilen, sollten in dieser Arbeit die pDCs aus dem peripheren Blut von Patienten mit allergischen Asthma und gesunden Normalpersonen umfangreich phänotypisch und funktionell verglichen werden.

Im Besonderen sollte die Expression von T-Zell-costimulatorischen Molekülen, Immunglobulin-Rezeptoren, Adhäsionsmolekülen, Aktivierungsmarkern (BDCA-3) und Toll-like Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie vergleichend untersucht werden. Zudem wurde das Migrationspotential der pDCs durch Analyse der Chemokinrezeptor-expression vergleichend bestimmt.

Um funktionelle Unterschiede zwischen den pDCs der Gruppen zu analysieren, sollten isolierte pDCs in Zellkulturversuchen mittels CpG-Oligonucleotiden stimuliert werden, um einen bakteriellen Infekt zu simulieren. Bestimmt werden sollte dann die Freisetzung inflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\alpha$  mittels ELISA.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material und Reagenzien

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

##### Allergiediagnostik

UniCAP 100, Pharmacia Diagnostics, Freiburg

##### Blutentnahme

Butterfly-Venenpunktionssystem BD-Valu-Set, BD Infusion Therapy, Becton Dickinson, Heidelberg; Multiadapter, Sarstedt, Nümbrecht; Blutentnahmebeutel, MacoPharma, Langen; Serumröhrchen, Sarstedt, Nümbrecht; EDTA-Röhrchen, Sarstedt, Nümbrecht

##### Brutschrank

HeraCell 150, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Langenselbold

##### Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer FACSCalibur mit Software CellQuest Pro, BD, Heidelberg; FACS-Röhrchen 5ml, BD Bioscience, Heidelberg

##### ELISA

ELISA-Reader, Anthos HTIII mit Software WinRead 2.3, Anthos Labtec Instruments GmbH, Wals, A; 96-well U-bottom Platten, Greiner Bio-one, Frickenhausen

##### Magnetische Zellseparation

AutoMACS Separator, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach; Acrodisc Syringe Filters, Pall Corporation, Ann Arbor, USA; Dualex Ultra, 0,22 µm Filter Unit, Millipore, Carrigtwohill, Ireland; Magnetsäulen (autoMACS Separating Columns), Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

##### Mikroskopie

Durchlichtmikroskop, Carl-Zeiss, Jena; Neubauer-Zählkammer, Roth, Karlsruhe; Objektträger, Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde

## Material und Methoden

### Pipetten

Kolbenhubpipetten Eppendorf Research, verschiedene Volumina, Eppendorf AG, Hamburg; 8-Kanal-Pipetten Eppendorf Research, Eppendorf AG, Hamburg; Pipettierhilfe Easypet, Eppendorf AG, Hamburg; 25 ml Einmalpipetten, Greiner Bio-One, Frickenhausen; Pipettenspitzen Ep-T.I.P.S., verschiedene Volumina, Eppendorf AG, Hamburg; Pipettenspitzen Safeseal Premium, verschiedene Volumina, Biozym Scientific GmbH, Hess, Oldendorf

### Reaktionsgefäße

1,5 ml und 2,0 ml, Sarstedt, Nümbrecht; 15ml und 50 ml, BD Falcon, Heidelberg

### Schüttler

Vortex-Mixer VM-300, Neolab Migge, Heidelberg; Rocky 3D, Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau

### Spirometrie

Flow Screen Jaeger, Würzburg

### Zentrifugation

Labofuge 400R mit den Rotoren 3325B, 8177, 8179 und den Einsätzen 8172, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Langenselbold;

## **2.1.2 Chemikalien und sonstige Reagenzien**

### BD Biosciences, Heidelberg

FACS Lysing Solution, FACS-Flow, FACS-Rinse, FACS-Clean

### Biochrom AG, Berlin

Biocoll, Penicillin/Streptomycin-Mix, Fetales Kälberserum (FCS)

### Fluka, Taufkirchen

Kaliumhydrogencitrat, Natriumchlorid, Saponin

## Material und Methoden

### Immunotools, Friesoythe

IL-6-ELISA, TNF- $\alpha$ -ELISA

### Invitrogen GmbH, Karlsruhe

FCS, PBS, RPMI-1640 + L-Glutamin

### InvivoGen, San Diego, USA

ODN2216

### Merck, Darmstadt

Aceton, Di-Natriumhydrogenphosphat, EDTA, Ethanol, Kaliumchlorid, Kaliumhydrogenphosphat, Kaliumhydroxid Plätzchen, Schwefelsäure, Türk'sche Lösung, Wasserstoffperoxid (30 %ig)

### Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit

### PBL Interferon Source, Piscataway, USA

IFN- $\alpha$ -ELISA

### Pharmacia Diagnostics, Freiburg

SX1 Inhalationsscreen: Lieschgras, Roggen, Birke, Beifuss, *Cladosporium herbarum*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, Katzenschuppen, Hundeschuppen, Gesamt-IgE-Kit

### Roth, Karlsruhe

Tween 20

### Sanquin, Amsterdam, NL

HPE-Puffer, Mausserum, Rinderserum, Streptavidin poly-HRP-Konjugat

### Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

BSA



### 2.1.3 Antikörper

Antigen	Klon	Isotyp	Markierung	Firma
CD123	9F5	IgG1	PE	BD Biosciences
CD123	AC145	IgG2a	APC	Miltenyi Biotec
HLADR	L243	IgG2a	PerCP	BD Biosciences
<u>Lin 1</u>				
CD3	SK7	IgG1	FITC	BD Biosciences
CD14	MΦP9	IgG2b	FITC	BD Biosciences
CD16	3G8	IgG1	FITC	BD Biosciences
CD19	SJ25C1	IgG1	FITC	BD Biosciences
CD20	L27	IgG1	FITC	BD Biosciences
CD56	NCAM16.2	IgG2b	FITC	BD Biosciences

**Tab 2.1.1: Antikörper zur Identifikation der pDCs.** Dargestellt ist das Antigen, gegen welches der entsprechende Antikörper gerichtet ist, die Klonvariante, die den Antikörper produziert, das Farbstoffmolekül und die herstellende Firma.

Antigen	Klon	Isotyp	Markierung	Firma
IgG1	X40	IgG1	APC, PE	BD Biosciences
CD32	FL18.26	IgG2b	APC	BD Biosciences
CD40	HB14	IgG1	APC	Invitrogen
CD54	HA58	IgG1	APC	BD Biosciences
CD64	10.1	IgG1	APC	Invitrogen
CD80	MEM-233	IgG1	APC	ImmunoTools
CD83	HB15e	IgG1	APC	Invitrogen
CD86	BU63	IgG1	APC	Invitrogen
BDCA-3	AD5-14H12	IgG1	APC	Miltenyi Biotec
FcεRIα	AER-37	IgG2b	APC	Bioscience
CD11b	M1/70.15.11.5	IgG2b	PE	Miltenyi Biotec
CD62L	Dreg-56	IgG1	PE	Invitrogen

**Tab 2.1.2: Antikörper zur Färbung der zu untersuchenden Antigene auf pDCs.** Dargestellt ist das Antigen, gegen welches der entsprechende Antikörper gerichtet ist, die Klonvariante, die den Antikörper produziert, das Farbstoffmolekül und die herstellende Firma.

Antigen	Klon	Isotyp	Markierung	Firma
CCR1	53504	IgG2b	PE	R+D Systems
CCR2	48607	IgG2b	APC	R+D Systems
CCR3	61828	IgG2a	APC	R+D Systems
CCR4	205410	IgG2b	APC	R+D Systems
CCR5	2D7	IgG2a	APC	BD Biosciences
CCR6	53103	IgG2b	APC	R+D Systems
CCR7	150503	IgG2a	APC	R+D Systems
CCR8	191704	IgG2b	APC	R+D Systems
CCR9	112509	IgG2a	APC	R+D Systems
CCR10	314305	IgG2a	APC	R+D Systems
CXCR1	5A12	IgG2b	APC	BD Biosciences
CXCR2	48311	IgG2a	APC	R+D Systems
CXCR3	1C6	IgG1	APC	BD Biosciences
CXCR4	12G5	IgG2a	APC	BD Biosciences
CXCR5	51505	IgG2b	APC	R+D Systems
CXCR6	56811	IgG2b	APC	R+D Systems
CXCR7	11G8	IgG1	APC	R+D Systems

**Tab 2.1.3: Antikörper zur Färbung der Chemokinrezeptoren auf pDCs.** Dargestellt ist das Antigen, gegen welches der entsprechende Antikörper gerichtet ist, die Klonvariante, die den Antikörper produziert, das Farbstoffmolekül und die herstellende Firma.

## 2.2 Puffer, Kulturmedien und Lösungen

### 2.2.1 Durchflusszytometrie

Erythrozyten-Lysispuffer: 10 × Lysing Solution mit H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> Auf 1fache Konzentration verdünnt.

Waschpuffer: D-PBS + 2% FCS<sub>inakt.</sub> (v/v) + 0,1 NaN<sub>3</sub> (w/v)

Permeabilisierungspuffer: 0,1% Saponin (w/v) in Waschpuffer

### 2.2.2 Zellisolation und Zellkultur

Waschpuffer: PBS + 2% FCS<sub>inakt.</sub> (v/v)

## Material und Methoden

Zellseparationsmedium: Biocoll

Kulturmedium RPMI-1640 + L-Glutamin + 10% FCS<sub>inakt.</sub> (v/v) +  
Penicillin (100U/ml) + Streptomycin (100µg/ml)

### 2.2.3 Magnetische Zellseparation

Laufpuffer: D-PBS + 2 mM EDTA + FCS 1%

Spülpuffer: D-PBS + 2 mM EDTA

Ethanol (70%ig): 700 ml Ethanol (96 %) + 300ml H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>

### 2.2.4 Sandwich-ELISA

<u>10 × PBS Stammlösung:</u>	NaCl	80,0 g
	KCL	2,0g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	14,4 g
	H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1000 ml
	pH	7,3

Bindungspuffer: 1 × PBS, pH 7,3

Blockpuffer 1: 1 × PBS + 2% BSA (w/v)

Waschpuffer: 1 × PBS + 0,05% Tween 20 (v/v)

Puffer 1: 1 × HPE-Puffer

Puffer 2: 1 × HPE-Puffer + 1% Mausserum (v/v) + 1%  
Rinderserum (v/v)

Substratpuffer (Lösung A): Kaliumdihydrogencitrat 30 mM, pH 4,1 mit KOH  
eingestellt

## Material und Methoden

<u>Substratstammlösung (Lösung B):</u>	Ethanol (96%)	45ml
	Aceton	5ml
	TMB	120 mg
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%ig)	100 µl
Lösung B wurde bei 2-8° C im Dunkeln gelagert.		

<u>Substratgebrauchslösung (Lösung C):</u>	Lösung A	10 ml
	Lösung B	0,5 ml
Lösung C wurde kurz vor Gebrauch frisch angesetzt		

<u>Stopplösung:</u>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 M
---------------------	--------------------------------	-----

## 2.3 Klinische Methoden

### 2.3.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte bei allen Probanden zwischen 7 und 9 Uhr morgens, um den möglichen Einfluss einer zirkadianen Rhythmik auf die pDCs zu minimieren. Im Liegen wurde mit der integrierten Kanüle eines Transfusionssystems eine Vena cubitalis punktiert und 300 ml Blut entnommen. Nach dem Abklemmen des Blutbeutels wurde eine weitere EDTA-Monovette mit Blut gefüllt. Das Blut wurde nach den allgemein gültigen Hygieneregeln entnommen. Um ein Nachbluten zu verhindern wurde die Punktionsstelle nach dem Entfernen der Kanüle mit einem Druckverband versorgt.

### 2.3.2 Spirometrie

Die Spirometrie gehört zu den Basisuntersuchungen im Bereich der Lungenfunktionsdiagnostik. Sie ist relativ einfach durchzuführen und für den Patienten nahezu nebenwirkungsfrei. Mit Hilfe der Spirometrie können dynamische Lungenvolumina, wie zum Beispiel die Vitalkapazität und die forcierte expiratorische Einsekundenkapazität gemessen werden, wodurch unterschieden werden kann, ob eine obstruktive oder restriktive Ventilationsstörung vorliegt. In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse der Spirometrie genutzt, um eine Obstruktion der peripheren Atemwege auszuschließen. Das Gerät, das für diese Studie verwendet wurde, misst mit Hilfe eines

Pneumotachographen die Atemstromstärke am Mund des Probanden. Dazu wird der Druck vor und nach einem Atemwiderstand aufgezeichnet, wobei der Druckabfall bei laminarer Strömung direkt proportional zur Atemstromstärke ist. Die zeitliche Integration der Atemstromstärke liefert dann das Atemzugvolumen. Um exakte Werte zu ermitteln, ist es wichtig, das Gerät täglich vor der Messung auf den aktuellen Luftdruck und die Temperatur zu eichen. Außerdem ist zu beachten, dass die Untersuchungsergebnisse stark von der Mitarbeit des Probanden abhängen, weshalb der Ablauf vor dem Test genau erklärt wurde. Zu Beginn der Untersuchung atmet der Proband ruhig ein und aus. Nach zwei bis drei Atemzyklen wird er aufgefordert, bei der nächsten Expiration möglichst tief auszuatmen um dann bei der folgenden Inspiration ein maximales Atemvolumen einzuatmen. Aus der maximalen Inspirationsstellung heraus soll der Patient dann mit größtmöglicher Kraftanstrengung ausatmen, bis er wieder die maximale endexpiratorische Stellung erreicht hat. Das Spirometer berechnet daraus eine Fluss-Volumen-Kurve und die Atemvolumina.

### **2.3.3 Bestimmung der Gesamt-IgE-Konzentration und spezifischer IgE-Antikörper**

Die allergische Immunreaktion Typ I geht meist mit einer erhöhten Gesamt-IgE-Konzentration im Serum einher. Oft können bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale auch spezifische Antikörper gegen Inhalationsantigene nachgewiesen werden. Deshalb wurde bei allen Probanden die Gesamt-IgE-Konzentration gemessen und eine Screeninguntersuchung durchgeführt, die IgE-Antikörper gegen die häufigsten Inhalationsantigene nachweist. Diese IgE-Bestimmungen wurden mit dem UniCAP100 System von Pharmacia Diagnostics durchgeführt, das auch in der klinischen Routine zur Allergiediagnostik eingesetzt wird. Als Inhalationsscreen wurde der kommerzielle sx1 Test verwendet, der IgE-Antikörper gegen Lieschgras, Roggen, Birke, Beifuß, *Cladosporium herbarum*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, Katzenschuppen und Hundeschuppen nachweist. Bei Kontrollpersonen führte eine Gesamt-IgE-Konzentration über 100kU/ml oder ein positives Ergebnis im Inhalationsscreen zum Ausschluss von der Studie. Das automatisierte Testsystem basiert auf einem Fluoreszenzimmunoassay. Dabei dient ein immobilisierter IgE-Antikörper bzw. ein immobilisiertes Antigen als Fänger für die IgE-Moleküle aus dem Serum des Probanden. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgt durch einen  $\beta$ -Galaktosidase-gekoppelten anti-IgE-Antikörper und dem Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid. Alle

Arbeitsschritte wurden nach Angaben des Herstellers und mit dessen Reagenzien durchgeführt.

### **2.4 Isolierung, Differenzierung und Kultivierung von Zellen**

#### **2.4.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut**

Die mononukleären Zellen wurden mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Diese Methode nutzt die Tatsache, dass humanes Vollblut aus verschiedenen Zellpopulationen besteht, die sich unter anderem auch in ihrer Dichte unterscheiden. In dieser Arbeit wurde Ficoll-Hypaque als Separationsmedium verwendet, das eine Dichte von 1,077g/ml aufweist. Da Erythrozyten und auch die meisten Granulozyten eine höhere Dichte als das Medium besitzen, diffundieren sie in das Medium hinein und pelletieren am Boden des Reaktionsgefäßes. Die Dichte der gesuchten PBMCs ist niedriger als die der Ficoll-Hypaque-Lösung, weshalb sie sich an der Grenze zwischen dem Separationsmedium und dem überschichteten Plasma ansammeln. Thrombozyten besitzen die geringste Dichte der Blutzellen und verbleiben auf Grund der geringen Wanderungsgeschwindigkeit größtenteils im Plasma, vorausgesetzt die Probe wird nicht zu lange zentrifugiert. Eine Kontamination der PBMCs mit Thrombozyten und basophilen Granulozyten ist bei dieser Methode aber nicht komplett zu vermeiden. Für die weitere Verwendung der Zellen war diese Kontamination aber nicht von Bedeutung. Zur Gewinnung der Blutproben wurde den Probanden eine Armvene punktiert und mit Hilfe eines Blutentnahme-Beutels 300ml antikoaguliertes Vollblut entnommen. Zur weiteren Verarbeitung wurde das venöse Blut mit PBS im Verhältnis 1:2 verdünnt. Für die Isolation wurden sterile 50 ml Tubes mit jeweils 15ml Ficoll-Hypaque bestückt und anschließend vorsichtig mit dem verdünnten Blut überschichtet. Danach wurden die Tubes 25 Minuten bei 600g, 8°C und ohne Bremse zentrifugiert, um die Auftrennung der Zellpopulationen entlang des Dichtegradienten zu verbessern. Nach der Zentrifugation befand sich zwischen dem Separationsmedium und dem Plasmaüberstand eine trübe Interphase in der sich die PBMCs befanden. Das Plasma wurde bis kurz oberhalb der Interphase abgenommen und verworfen. Die Interphase wurde vorsichtig und möglichst ohne Kontamination durch das Separationsmedium abpipetiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und 10 min bei 400g und 8°C zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 1ml PBS resuspendiert und die Zellzahl der Suspension bestimmt.

### 2.4.2 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl in der Suspension wurden die Zellkerne mit Türkscher Lösung angefärbt, indem ein Teil der Zellsuspension mit neun Teilen der Färbelösung für 5 min inkubiert wurde. Anschließend wurde eine Neubauer-Zählkammer mit 10 µl der gut durchmischten Zellsuspension befüllt. Unter dem Mikroskop wurden bei 200-facher Vergrößerung mindestens 4 Großquadrate der Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl wurde als Mittelwert der 4 Großquadrate  $\times 10^5$  Zellen berechnet.

### 2.4.3 Immunmagnetische Separation der pDCs

Mit Hilfe der immunmagnetischen Separation können auch kleine Zellpopulationen einer Zellsuspension mit einer hohen Ausbeute und auch einer hohen Reinheit isoliert werden. Die Zellen werden dazu mit Antikörpern magnetisch markiert und anschließend an einer ferromagnetischen Säule vorbeigeleitet, die sich in einem Magnetfeld befindet. Zellen, die keinen magnetbeadgekoppelten Antikörper tragen, können sofort am Ende der Säule aufgefangen werden. Die markierten Zellen bleiben dagegen an der Säule hängen und können nach dem Ausschalten des Magnetfelds ausgewaschen und aufgefangen werden.

Um etwa  $10^6$  pDCs zu gewinnen wurden 250- 300ml Vollblut verarbeitet. Nach der Isolierung der PBMCs wurden die Zellen mit einem Biotin-markierten Antikörper-Cocktail inkubiert (10min, 4°C), der sich gegen alle anderen PBMCs außer den pDCs richtet. Nach zwei Waschschritten mit Laufpuffer wurde die Suspension mit Microbeads gekoppelten Anti-Biotin-Antikörpern inkubiert. Auch danach wurden die überschüssigen Antikörper durch zweimaliges Waschen mit Laufpuffer entfernt. Die markierten Zellen wurden anschließend in 500 µl Laufpuffer aufgenommen und mit Hilfe des autoMACS separiert. Die pDCs befanden sich als Negativ-Fraktion in der Suspension, die das Magnetfeld verlässt. Um die Reinheit des Eluats zu überprüfen wurden 50 µl der Zellsuspension mit Antikörpern gegen CD123 und BDCA-2 inkubiert und anschließend im Durchflußzytometer gemessen. Für die weitere Verarbeitung wurden nur Proben verwendet, deren pDC-Anteil über 90% lag.

#### 2.4.4 Kultivierung der pDCs

Die frisch isolierten pDCs wurden mit PBS gewaschen und mit Kulturmedium auf eine Zellzahl von  $10^6$  Zellen/ml eingestellt. Um das sekretorische Potential der pDCs zu messen wurden die Zellen mit  $5\mu\text{M}$  ODN2216 stimuliert und bei  $37^\circ\text{C}$  für 12-14 Stunden inkubiert. Danach wurde der Überstand der Zellkultur für die Bestimmung der IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\alpha$ -Konzentration abgenommen.

#### 2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit Zellen einer Zellsuspension einzeln bezüglich ihrer Größe und intrazellulären Ausstattung zu untersuchen. Dazu werden die Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Entsprechende Detektoren registrieren dann das Vorwärtstreulicht (FSC, *forward scatter*), das als Maß für die Größe der Zelle dient und das Seitwärtstreulicht (SSC, *sideward scatter*), welches eine Aussage über die Granularität der Zelle zulässt. Mit Hilfe dieser beiden Parameter ist eine Differenzierung der Leukozyten in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten möglich. Mit dem hier verwendeten Zytometer können an einer Zelle gleichzeitig vier weitere Parameter bestimmt werden. Dazu müssen die Zellen vor der Messung mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. In dieser Arbeit erfolgte die Färbung indirekt über fluoreszenzmarkierte Antikörper. Es ist dabei darauf zu achten, dass die Fluoreszenzfarbstoffe durch den im Gerät vorhandenen Laser angeregt werden und sich die Emissionsmaxima der Fluorochrome unterscheiden (Tab 2.5.1).

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Anregungswellenlänge
FITC	495nm	519nm	488nm
PE	480nm, 565nm	578nm	488nm
PerCP	482nm	678nm	488nm
APC	650nm	660nm	633nm

**Tab 2.5.1 Fluorochrome.** In der Tabelle sind die Absorptionsmaxima, die Emissionsmaxima und die Anregungswellenlängen der zur Färbung der pDCs verwendeten Fluorochrome aufgelistet



### 2.5.1 Markierung von Oberflächenantigenen auf Vollblutleukozyten

Zur Markierung der Oberflächenmoleküle wurden verschiedene FACS-Röhrchen mit den Antikörperlösungen entsprechend dem Schema in den Tabellen 2.5.2, 2.5.3 und 2.5.4 bestückt. Anschließend wurde jeder Ansatz mit 70µl EDTA-Vollblut versetzt und 20min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Erythrozyten zu lysieren, wurden zu jeder Probe 1000µl Lysing-Solution pipettiert. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und im Dunkeln wurden die Zellen bei 400g für 5min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschrte, wobei die Zellen jeweils mit 1ml Waschpuffer versetzt und dann erneut abzentrifugiert wurden. Für die Messung wurden die Zellen in 200µl PBS resuspendiert.

Nr.	FITC	PE	PerCP	APC
1	Lin1	CD123	HLA-DR	IgG
2	Lin1	CD123	HLA-DR	CD11a
3	Lin1	CD123	HLA-DR	CD18
4	Lin1	CD123	HLA-DR	CD23
5	Lin1	CD123	HLA-DR	CD32
6	Lin1	CD123	HLA-DR	CD40
7	Lin1	CD123	HLA-DR	CD54
8	Lin1	CD123	HLA-DR	CD64
9	Lin1	CD123	HLA-DR	CD80
10	Lin1	CD123	HLA-DR	CD83
11	Lin1	CD123	HLA-DR	CD86
12	Lin1	CD123	HLA-DR	BDCA-3
13	Lin1	CD123	HLA-DR	FcεRIα

**Tab 2.5.2: Ansätze 1-13 zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Oberflächenantigenen auf pDCs.** Die pDCs wurden mit jeweils vier verschiedenen Antikörper-gekoppelten Fluorochromen gefärbt. Dargestellt ist die Kombination der verschiedenen Antikörper in einer Probe. In den Ansätzen 1 – 29 wurden die untersuchten Antigene mit APC-markierten Antikörpern gefärbt.

Nr.	FITC	PE	PerCP	APC
14	Lin1	CD123	HLA-DR	CCR2
15	Lin1	CD123	HLA-DR	CCR3
16	Lin1	CD123	HLA-DR	CCR4
17	Lin1	CD123	HLA-DR	CCR5
18	Lin1	CD123	HLA-DR	CCR6
19	Lin1	CD123	HLA-DR	CCR7
20	Lin1	CD123	HLA-DR	CCR8
21	Lin1	CD123	HLA-DR	CCR9
22	Lin1	CD123	HLA-DR	CCR10
23	Lin1	CD123	HLA-DR	CXCR1
24	Lin1	CD123	HLA-DR	CXCR2
25	Lin1	CD123	HLA-DR	CXCR3
26	Lin1	CD123	HLA-DR	CXCR4
27	Lin1	CD123	HLA-DR	CXCR5
28	Lin1	CD123	HLA-DR	CXCR6
29	Lin1	CD123	HLA-DR	CXCR7

**Tab 2.5.3 Ansätze 14-29 zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Chemokinrezeptoren auf pDCs.** Die pDCs wurden mit jeweils vier verschiedenen Antikörper-gekoppelten Fluorochromen gefärbt. Dargestellt ist die Kombination der verschiedenen Antikörper in einer Probe. In den Ansätzen 1 – 29 wurden die untersuchten Antigene mit APC-markierten Antikörpern gefärbt.

Nr.	FITC	PE	PerCP	APC
30	Lin1	IgG	HLA-DR	CD123
31	Lin1	CD11b	HLA-DR	CD123
32	Lin1	CD62L	HLA-DR	CD123
33	Lin1	OX40L	HLA-DR	CD123
34	Lin1	TRAIL	HLA-DR	CD123
35	Lin1	CCR1	HLA-DR	CD123

**Tab 2.5.4 Ansätze 30-35 zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Oberflächenantigenen auf pDCs.** Die pDCs wurden mit jeweils vier verschiedenen Antikörper-gekoppelten Fluorochromen gefärbt. Dargestellt ist die Kombination der verschiedenen Antikörper in einer Probe. In den Ansätzen 30 - 35 wurden die untersuchten Antigene mit PE-markierten Antikörpern gefärbt.

### 2.5.2 Markierung intrazellulärer Antigene in Vollblutleukozyten

Um intrazelluläre Antigene zu markieren wurden zuerst jeweils 70µl EDTA-Vollblut mit den Antikörpern gegen Oberflächenantikörper inkubiert. Wie oben beschrieben wurden auch bei diesen Ansätzen die Erythrozyten durch Zugabe von Lysing-Solution lysiert. Nach dem Pelletieren wurden die Zellen in jeweils 1ml Permeabilisierungslösung resuspendiert und 10min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern gegen intrazelluläre Antikörper für weitere 20min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert (Tab 2.5.5). Danach schlossen sich zwei Waschschriffe mit jeweils 1ml Permeabilisierungspuffer an. Die Zellen wurden für die Messung in 200µl PBS resuspendiert.

Nr.	FITC	PE	PerCP	APC
36	Lin1	IgG1	HLA-DR	CD123
37	Lin1	TLR9	HLA-DR	CD123

**Tab 2.5.5 Ansätze zur durchflusszytometrischen Bestimmung der intrazellulären Expression von TLR9 in pDCs** Die pDCs wurden mit jeweils vier verschiedenen Antikörper-gekoppelten Fluorochromen gefärbt. Dargestellt ist die Kombination der verschiedenen Antikörper in einer Probe. TLR9 wurde mit einem PE-markiertem Antikörper gefärbt.

## 2.6 Enzymimmunoassays

### 2.6.1 Quantitative Bestimmung von IL-6, TNF- $\alpha$ und IFN- $\alpha$ mittels Sandwich-ELISA

Beim Sandwich-ELISA wird das zu detektierende Antigen mit Hilfe eines antigenspezifischen Fängerantikörpers an der Oberfläche des Reaktionsgefäßes immobilisiert. Über einen zweiten antigenspezifischen Antikörper wird das Enzym, das später die Umsetzung des Substrats katalysiert, an das Antigen gebunden. Anhand des Substratumsatzes kann dann die Antigenkonzentration berechnet werden.

Für die Bestimmung der IL-6- und TNF- $\alpha$ -Konzentration in den Überständen der pDC-Kultur wurden die Kavitäten der Mikrotiterplatten mit jeweils 100µl des Fängerantikörper (1:100 verdünnt mit Bindungspuffer) befüllt und bei 2-8°C für 16h inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch fünfmaliges Waschen mit PBS entfernt. Um eine unspezifische Bindung des Antigens an freie Proteinbindungsstellen

zu vermeiden wurden die Kavitäten anschließend mit jeweils 200µl Blockpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Daran schlossen sich 5 Waschschrte mit Waschpuffer an. Es folgte die Auftragung der Standards und Proben, die vorher jeweils im Verhältnis 2:1 mit Puffer 1 verdünnt wurden. Bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln wurden die Ansätze für eine Stunde inkubiert. Die Kavitäten wurden erneut fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit jeweils 100µl des biotinylierten Detektionsantikörper befüllt, der mit Puffer 2 im Verhältnis 1:100 verdünnt wurde. Puffer 2 enthielt jeweils 1% Maus- und Rinderserum, um unspezifische Bindungen des Detektionsantikörpers zu verringern. Überschüssige Antikörper wurden in fünf Waschschrten mit Waschpuffer aus den Kavitäten entfernt. Danach wurden die Mikrotiterplatten für 20min bei Raumtemperatur mit dem Streptavidin-Poly-HRP-Konjugat (1:5000 in Puffer 1; 100µl/Kavität) inkubiert. Daran schloss sich eine weitere Waschserie aus fünf Waschschrten an. Anschließend wurde die enzymatische Nachweisreaktion durch Zugabe von jeweils 100µl der Substratlösung C gestartet. Die Platten wurden zwischen 10 und 30min inkubiert, bis die Standardreihe eine abgestufte Blaufärbung von hell bis dunkel zeigte. Durch Zugabe von jeweils 100µl Stopplösung wurde die Nachweisreaktion beendet und ein Farbumschlag von blau zu gelb erreicht. Sofort im Anschluss wurde die Absorption bei 450nm und bei 620nm als Referenz mit dem ELISA-Reader Anthos HTIII gemessen. Die Eichkurven und die Antigenkonzentrationen wurden mit der Software WinRead 2.3 berechnet.

Die IFN- $\alpha$ -Konzentration in den Überständen der pDC-Kultur wurde mit Hilfe eines kommerziell gefertigten ELISA-Kits entsprechend den Herstellerangaben bestimmt.

### 2.7 Probanden

Für diese Studie wurden mit Hilfe von Aushängen Patienten mit Asthma und Kontrollpersonen aus der Allgemeinbevölkerung rekrutiert. In die Gruppe der Patienten mit Asthma wurden nur Personen aufgenommen, die seit mindestens zwei Jahren an allergischem Asthma bronchiale erkrankt sind. Die Diagnose wurde von unabhängigen Ärzten gestellt. Um die allergische Genese des Asthmas zu verifizieren wurde vor Aufnahme in die Studie die Gesamt-IgE-Konzentration (Median: 213kU/ml) und das Vorhandensein spezifischer IgE-Antikörper gegen die häufigsten Inhalationsantigene bestimmt. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren alle Probanden des Patientenkollektivs ohne Beschwerden und seit mindestens acht Wochen ohne Therapie mit inhalativen Kortikosteroiden (Tab 2.7.1). In die Kontrollgruppe wurden nur

## Material und Methoden

Probanden aufgenommen, bei denen keine spezifischen IgE-Antikörper gegen häufige Inhalationsantigene nachgewiesen werden konnten und deren Gesamt-IgE Konzentration unter 100kU/ml lag (Median: 11,6kU/ml), wodurch eine atopische Diathese ausgeschlossen wurde. Die Probanden beider Gruppen hatten keine weiteren chronischen oder akuten Erkrankungen, waren Nichtraucher und zeigten in den letzten vier Wochen vor der Blutentnahme keine Anzeichen für einen viralen oder bakteriellen Infekt. Bezüglich Alter (A: 25,5 Jahre; NP: 26 Jahre) und Geschlecht (A: m= 11; w= 9; NP: m= 6; w= 12) unterschied sich die Gruppe der Asthmatiker nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

Geschlecht	Alter	Total IgE (kU/l)	FEV <sub>1</sub> (l)	FEV <sub>1</sub> (% pred)	Medikation
m	32	203	6,2	124	-
w	25	793	4,6	119	BA
m	40	834	4,8	122	BA,CR
w	31	173	2,6	93	BA,CR
w	23	2467	3,8	108	BA
m	22	1133	4,4	91	BA,CR
w	24	98	4,4	129	-
w	21	179	3,6	104	OAH
w	19	498	2,9	78	BA, OAH
m	21	420	3,8	95	BA, ICS
w	28	164	2,8	87	BA
m	26	205	3,7	79	BA, ICS
m	27	687	5,2	114	-
w	29	217	3,0	95	BA
m	38	123	4,7	106	BA, ICS
m	24	434	4,9	107	BA, ICS
m	21	209	5,3	106	BA, ICS
w	21	14	3,2	100	BA, ICS
m	26	247	4,1	87	BA, ICS
m	27	105	3,2	71	BA, ICS
Mean	26	213	3,0	102	
SD	6	557	1,0	15	

**Tab 2.7.1 Patientencharakteristika.** Dargestellt ist das Geschlecht, das Alter, die Gesamt-IgE-Konzentration, FEV<sub>1</sub> in Absolutwerten und als prozentualer Anteil des erwarteten FEV<sub>1</sub>-Wertes sowie die Medikation. BA: Beta-Agonist, CR Cromoglycinsäure, OHA: orale Antihistaminika, ICS: inhalative Glukokortikoide

### **2.8 Statistik**

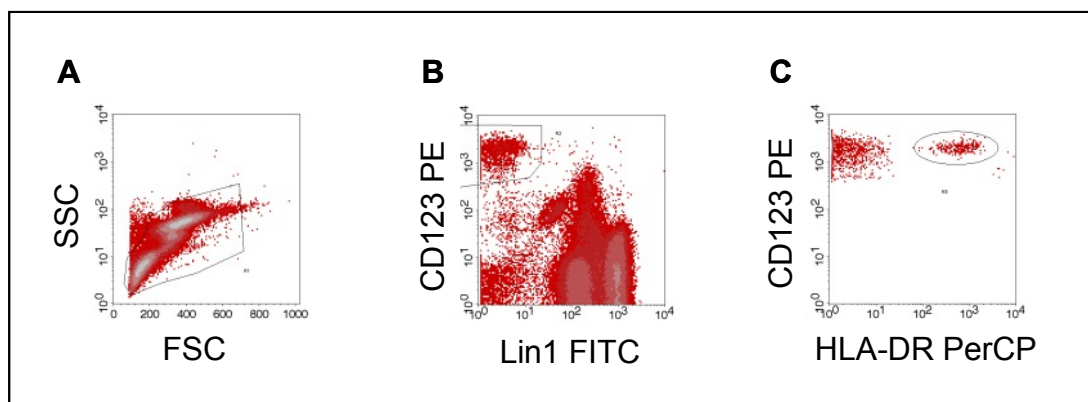
Für die statistische Analyse wurde das Programm SPSS 12.0 verwendet. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test, wobei das Signifikanzniveau in allen Fällen auf  $p < 0,05$  festgesetzt wurde.

Die Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe von Box-Plots, die den Median in Form des Querbalkens und die Interquartilsabstände als Boxen abbilden. Ausreißer und Extremwerte wurden nicht berücksichtigt.

### 3. Resultate

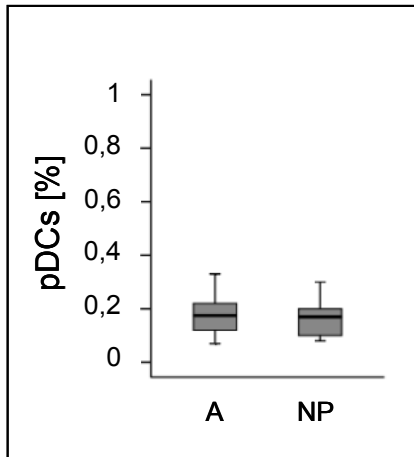
#### 3.1 Identifizierung der pDCs in peripherem Blut von Patienten mit Asthma und Normalpersonen.

In dieser Studie wurde die Expression verschiedener Moleküle auf pDCs aus peripherem Vollblut von Patienten mit allergischem Asthma bronchiale und Normalpersonen untersucht. Die pDCs wurden mit Hilfe eines 4-Farben-Durchflusszytometers als  $\text{lin}^{\text{neg}}/\text{HLA-DR}^+/\text{CD123}^+$  identifiziert (Abb. 3.1.1). Um eine unspezifische Bindung der spezifischen Antikörper auszuschließen wurde jeweils eine Probe mit einem Isotyp-Kontrollantikörper inkubiert, der kein humanes Antigen erkennt. Bei allen Probanden zeigten weniger als 1% der registrierten pDCs eine Färbung durch den Kontrollantikörper. Insgesamt lag der prozentuale Anteil der pDCs an allen Leukozyten zwischen 0,07 und 0,33%, wobei zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied beobachtet werden konnte (Abb 3.1.2).



**Abb 3.1.1: Strategie zur Identifikation der pDCs aus dem Vollblut von Patienten mit Asthma und Normalpersonen**

Vollblutproben wurden wie in Material und Methoden beschrieben vorbehandelt und anschließend durchflußzytometrisch analysiert. **A:** Im FSC/SSC-Plot wurden alle Leukozyten markiert, die zur weiteren Identifizierung der pDCs herangezogen wurden. **B:** Im nächsten Schritt wurden  $\text{lin1}^{\text{neg}}/\text{CD123}^+$  Zellen markiert. **C:** Aus der in B markierten Subpopulation wurden die pDCs im HLA-DR/CD123-Plot als  $\text{HLA-DR}^+/\text{CD123}^+$  identifiziert.

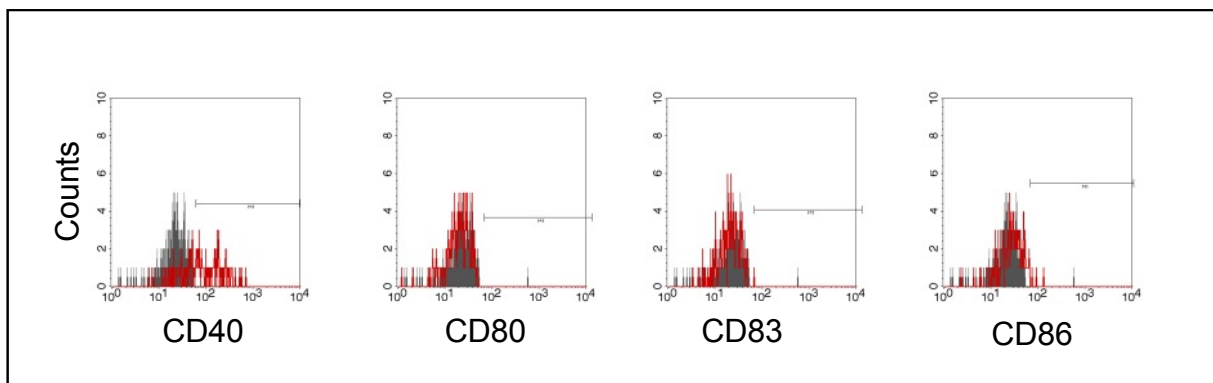


**Abb. 3.1.2: Prozentualer Anteil der pDCs im Vollblut**

Leukozyten aus dem Vollblut wurden wie in Material und Methoden beschrieben vorbereitet. pDCs wurden als  $\text{lin}^{\text{neg}}/\text{HLA-DR}^+/\text{CD123}^+$ -Zellen entsprechend der in Abb. 3.1.1 beschriebenen Gating-Strategie identifiziert.

## 3.2 Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf pDCs

### 3.2.1 Expression der costimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD83, CD86 und OX40L

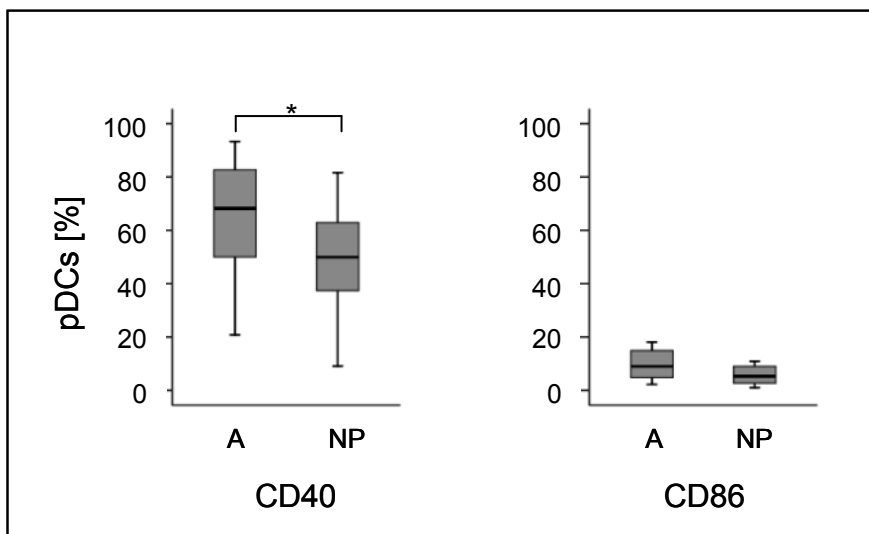


**Abb. 3.2.1: Exemplarische Darstellung Expression der costimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD83 und CD86.** Vollblut wurde wie in Material und Methoden beschrieben behandelt. pDCs wurden als  $\text{lin}^{\text{neg}}/\text{HLA-DR}^+/\text{CD123}^+$  identifiziert. Die Histogramm-Plots stellen exemplarisch die Expression der Oberflächenmoleküle eines Probanden dar. Grau: IgG-Kontrolle, rot: Signal des spezifischen Antikörpers

Um das costimulatorische Potenzial der pDCs von Patienten mit Asthma und Normalpersonen zu vergleichen, wurden verschiedenen Vollblutproben jeweils mit Antikörpern gegen CD40, CD80, CD83, CD86 und OX40L inkubiert und anschließend deren Expression im Durchflußzytometer gemessen. pDCs von Patienten mit Asthma waren signifikant ( $p = 0,009$ ) häufiger CD40-positiv als die pDCs der Vergleichsgruppe (Median: A: 68% vs NP: 50%) (Abb. 3.2.2). CD80 und CD83 konnten weder auf pDCs von Normalpersonen noch auf pDCs von Patienten mit Asthma nachgewiesen werden (Abb



3.2.1). Der Anteil CD80- und CD83-positiver pDCs lag in beiden Gruppen unter 1%. CD86 wurde dagegen auf pDCs beider Gruppen nachgewiesen, wobei die pDCs der Patienten mit Asthma tendenziell ( $p = 0,067$ ) häufiger CD86 exprimierten als die pDCs der Vergleichsgruppe (Median: A: 9% vs NP: 5,3%) (Abb. 3.2.2). Auch OX40L wurde auf den pDCs von Patienten mit Asthma (Median: 22,4%) und Normalpersonen (Median: 26,1%) nachgewiesen, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festzustellen war. Durch die Vorbehandlung mit Corticosteroiden wurde die Expression von OX40L verringert. (Siehe Kapitel 3.3.1)



**Abb. 3.2.2: Expression der costimulatorischen Moleküle CD40 und CD86:** Die Boxplots zeigen den prozentualen Anteil CD40- und CD86-positiver pDCs. Die Berechnung von Signifikanzen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests, wobei  $p < 0,05$  (\*) als statistisch signifikant gewertet wurde. A: Patienten mit Asthma; NP: Normalpersonen

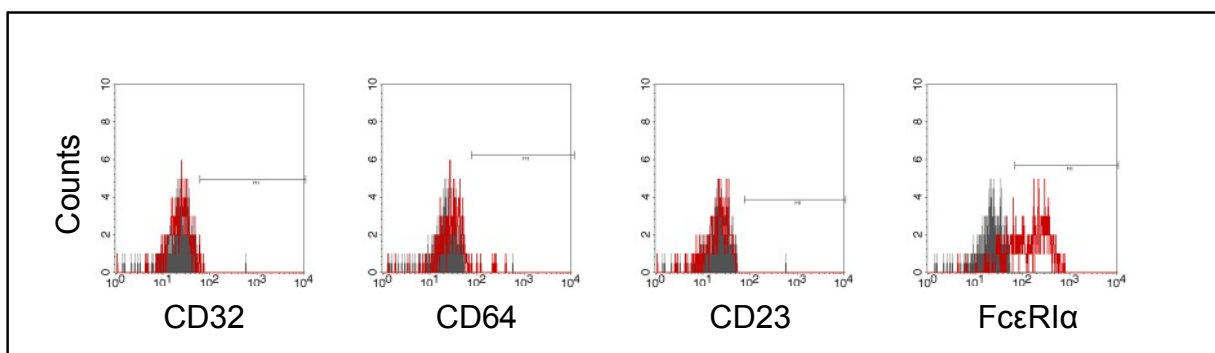
## 3.2.2 Expression der IgG-Rezeptoren CD32 und CD64 und der IgE-Rezeptoren CD23 und FcεRIα

pDCs von Normalpersonen und Patienten mit Asthma wurden vergleichend auf die Expression der IgG-Rezeptoren, CD32 und CD64, und der IgE-Rezeptoren, CD23 und FcεRIα, untersucht. In beiden Gruppen war ein geringer Prozentsatz der pDCs positiv für CD32. Ein signifikanter Unterschied konnte für die Expression von CD32 nicht nachgewiesen werden, es zeichnete sich aber ein Trend ( $p=0,063$ ) ab, dass pDCs von Patienten mit Asthma (Median: 3,5%) häufiger CD32 positiv sind als pDCs der Kontrollgruppe (Median: 0,5%). Der hochaffine IgG-Rezeptor CD64 wurde von den

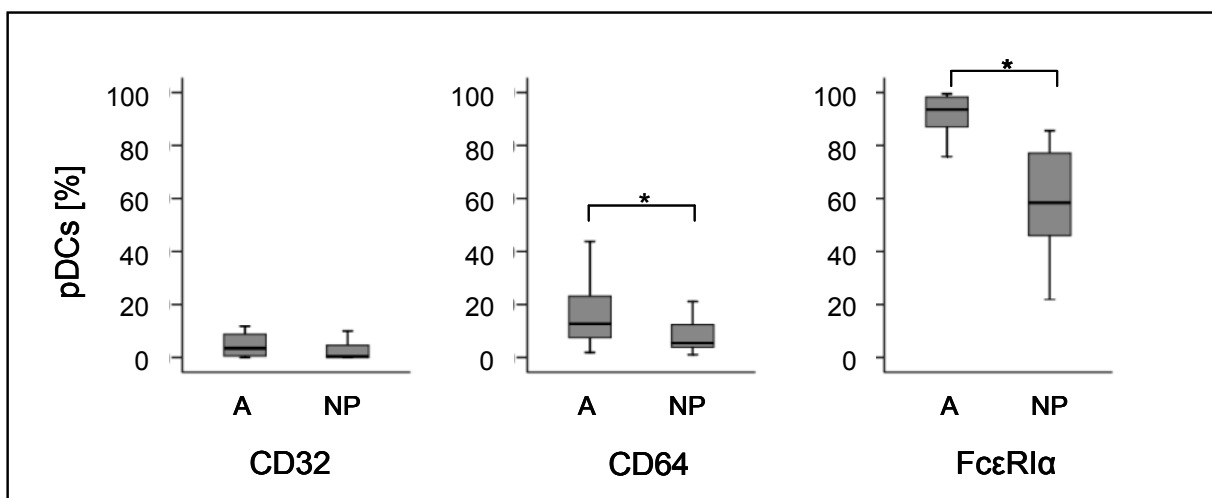
## Resultate

pDCs der Patienten mit Asthma (Median: 12,7%) signifikant häufiger ( $p=0,035$ ) exprimiert als von den pDCs aus der Gruppe der Normalpersonen (Median: 5,5%) (Abb. 3.2.4).

Wie schon aus der Literatur bekannt, waren auch in dieser Untersuchung die pDCs aus der Gruppe der Patienten mit Asthma signifikant häufiger positiv für den hochaffinen IgE-Rezeptor  $Fc\epsilon R1\alpha$  als die pDCs aus der Kontrollgruppe (Median: A: 93,6 % vs NP: 58,5%;  $p=0,000$ ). (Abb. 3.2.4). Im Gegensatz dazu war der niedrigaffine IgE-Rezeptor CD23 weder auf pDCs von Asthmatikern noch auf pDCs der Normalpersonen nachweisbar (Abb. 3.2.3).



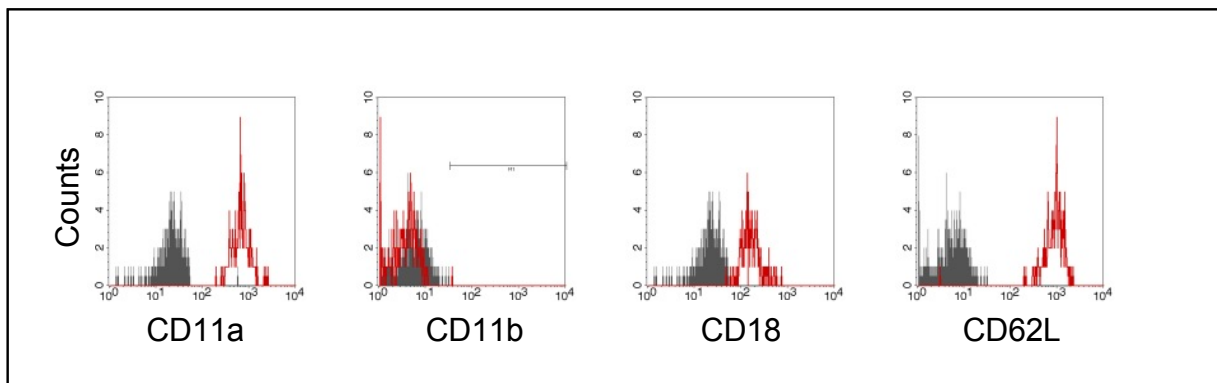
**Abb. 3.2.3: Exemplarische Darstellung der Expression der Immunglobulinrezeptoren CD32, CD64, CD23 und  $Fc\epsilon R1\alpha$ .** Vollblut wurde wie in Material und Methoden beschrieben behandelt. pDCs wurden als  $lin1^-/HLA-DR^+/CD123^+$  identifiziert. Die Histogramm-Plots stellen exemplarisch die Expression der Immunglobulinrezeptoren eines Probanden dar. Grau: IgG-Kontrolle, Rot: Signal des spezifischen Antikörpers



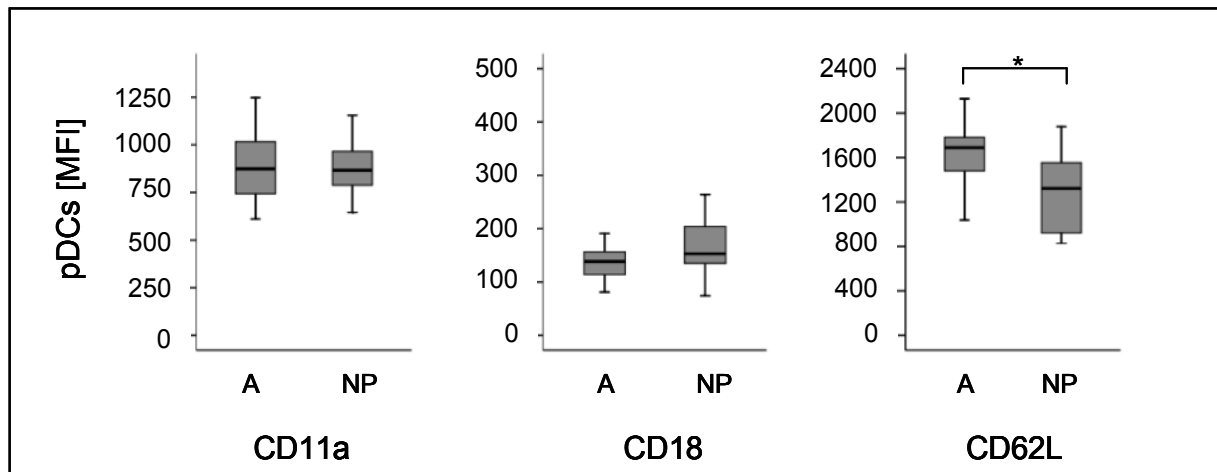
**Abb. 3.2.4: Expression der Immunglobulinrezeptoren CD32, CD64, und  $Fc\epsilon R1\alpha$ .** In den Boxplots ist der prozentuale Anteil  $CD32^+$ -,  $CD64^+$ - und  $Fc\epsilon R1\alpha^+$ -pDCs von Patienten mit Asthma (A) und Normalpersonen (N) dargestellt. Die Berechnung von Signifikanzen zwischen den Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests.  $p < 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant definiert.

### 3.2.3 Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a, CD11b, CD18, CD54 und CD62L

Untersucht wurden die Adhäsionsmoleküle CD11a, CD11b, CD18, CD54 und CD62L. CD11b konnte nicht auf der Oberfläche von pDCs nachgewiesen werden (Abb. 3.2.5). Im Gegensatz dazu waren nahezu alle pDCs positiv für CD11a, CD18, CD54 und CD62L, weshalb für den Vergleich der beiden Gruppen die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) und nicht der prozentuale Anteil positiver pDCs herangezogen wurde. Bezüglich der Integrine CD11a (Median: A: 874 vs NP: 866) und CD18 (Median: A: 139 vs NP: 153) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den pDCs von Patienten mit Asthma und Normalpersonen festgestellt werden (Abb. 3.2.6). CD62L wurde dagegen von den pDCs aus der Gruppe der Patienten mit Asthma signifikant stärker exprimiert als von den pDCs der Kontrollgruppe (Median: A: 1689 vs NP: 1322;  $p=0,002$ ). (Abb. 3.2.6). Die Expression von CD54 wurde durch die Vorbehandlung mit inhalativen Corticosteroiden signifikant erniedrigt. (Siehe Kapitel 3.3.1).



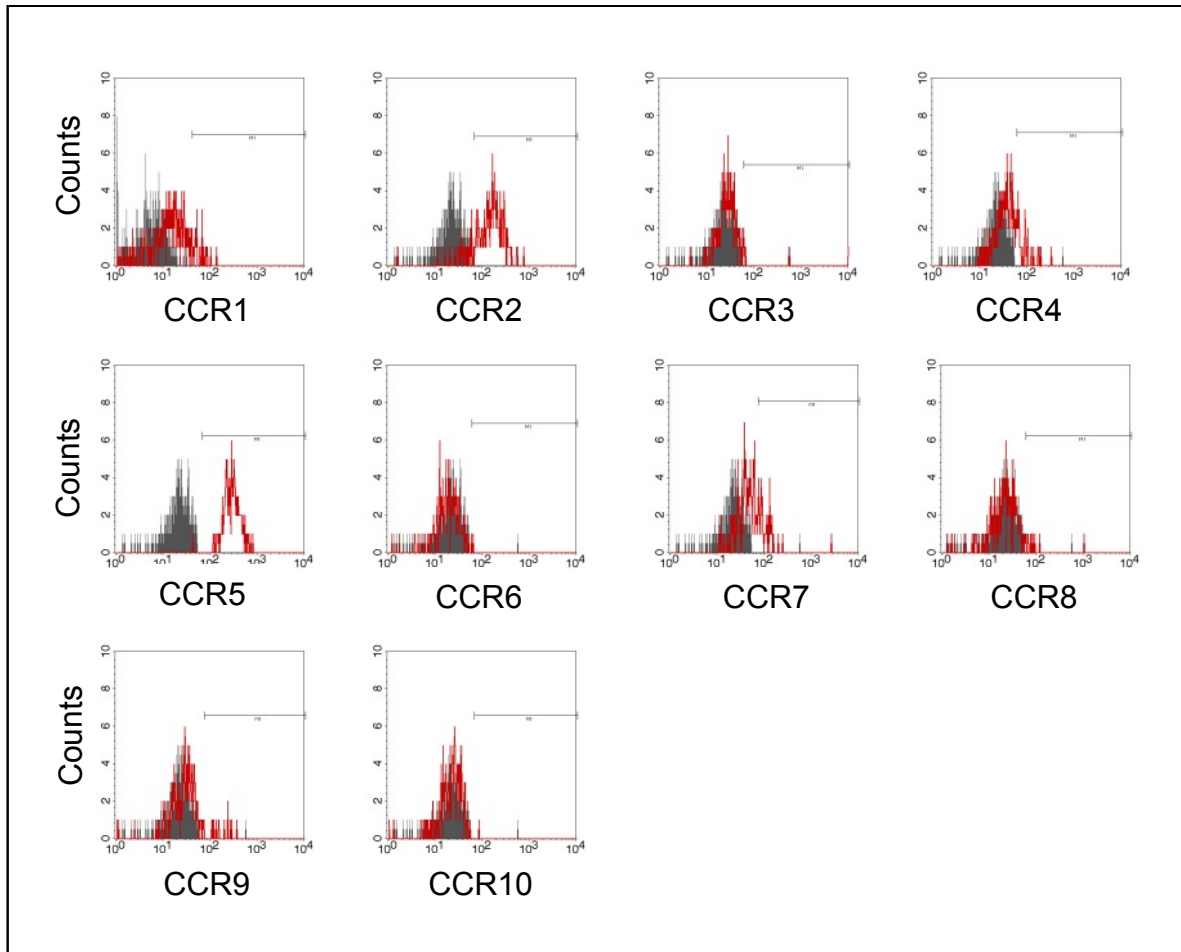
**Abb. 3.2.5 : Exemplarische Darstellung der Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a, CD11b, CD18 und CD62L.** Vollblut wurde wie in Material und Methoden beschrieben behandelt. pDCs wurden als  $\text{lin}1^-/\text{HLA-DR}^+/\text{CD123}^+$  identifiziert. Die Histogramm-Plots stellen exemplarisch die Expression der Immunglobulinrezeptoren eines Probanden dar. Grau: IgG-Kontrolle, rot: Signal des spezifischen Antikörpers



**Abb 3.2.6: Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a, CD18, und CD62L.** In den Boxplots wird der prozentuale Anteil CD11a<sup>+</sup>-, CD18<sup>+</sup>- und CD62L<sup>+</sup>-pDCs von Patienten mit Asthma (A) und Normalpersonen (NP) dargestellt. Die Berechnung von Signifikanzen zwischen den Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant definiert.

### 3.2.4 Expression von Chemokinrezeptoren

Über die Expression von Chemokinrezeptoren können Rückschlüsse auf das Migrationspotential von Zellen gezogen werden. Um die pDCs bezüglich der Chemokinrezeptoren umfassend zu charakterisieren, wurden sie mit Antikörpern gegen CCR1-10 und CXCR1-7 inkubiert und anschließend im Durchflußzytometer untersucht. Die Rezeptoren CCR3 und CCR6 konnten auf den pDCs beider Gruppen nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.2.9). Auch CXCR1 wurde nur auf einem geringen Prozentsatz der pDCs gemessen. Auf den pDCs aus der Gruppe der Patienten mit Asthma war der Rezeptor aber signifikant häufiger (Median: A: 3,4; NP: 1,5;  $p=0,009$ ) vorhanden als auf den pDCs der Kontrollgruppe (Abb. 3.2.10). Im Gegensatz dazu waren nahezu alle pDCs der Patienten mit Asthma und auch der Normalpersonen positiv für CCR5 (Abb. 3.2.7). Auch CCR2 wurde auf einem Großteil der pDCs nachgewiesen, wobei die pDCs der Patienten mit Asthma signifikant häufiger positiv für CCR2 (Median: A: 97,4; NP: 91,0;  $p=0,003$ ) waren (Abb. 3.2.9). Die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR7, CCR8, CXCR4 und CXCR7 wurden auf den pDCs beider Gruppen detektiert, es konnte aber kein signifikanter Unterschied gefunden werden (Abb 3.2.9 und 3.2.10).

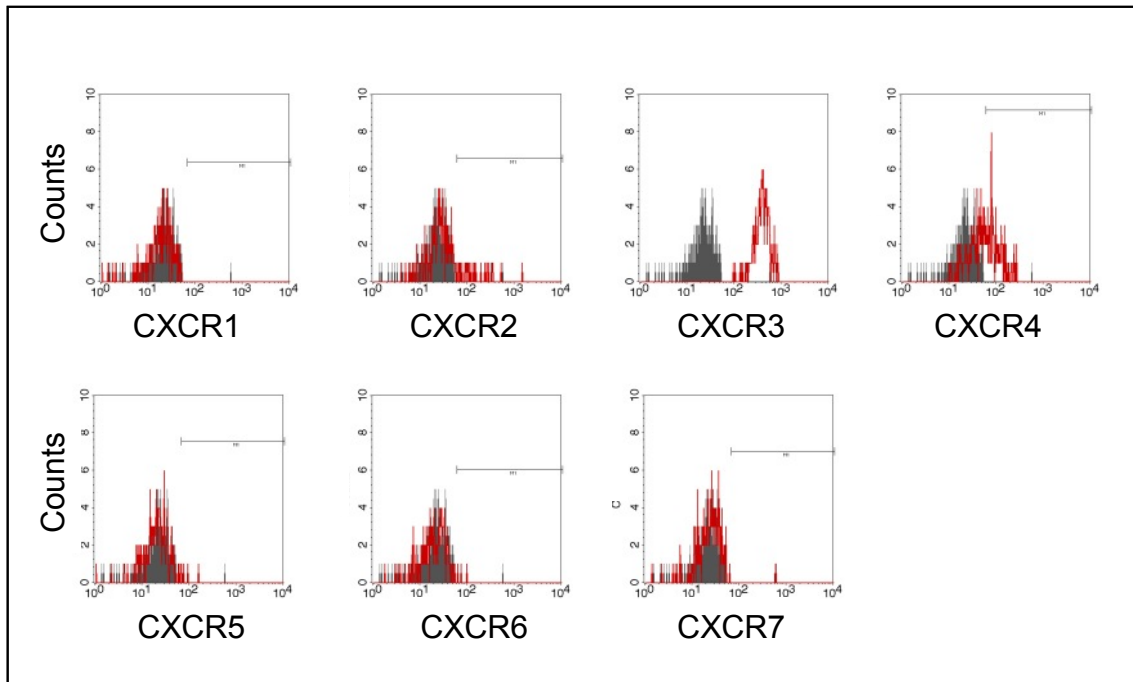


**Abb.3.2.7: Exemplarische Darstellung der Expression der Chemokinrezeptoren CCR1 - 10.** Vollblut wurde wie in Material und Methoden beschrieben behandelt. pDCs wurden als  $\text{lin}1^-/\text{HLA-DR}^+/\text{CD123}^+$  identifiziert. Die Histogramm-Plots stellen exemplarisch die Expression der Chemokinrezeptoren eines Probanden dar. Grau: IgG-Kontrolle, rot: Signal des spezifischen Antikörpers

CCR4 wurde auf den pDCs von Patienten mit Asthma und Normalpersonen nachgewiesen, wobei die pDCs aus der Gruppe der Patienten mit Asthma signifikant häufiger positiv für CCR4 waren als die pDCs der Kontrollgruppe (Median: A: 77,2 vs NP: 50,0;  $p=0,024$ ) (Abb. 3.2.9). Auch für die Chemokinrezeptoren CCR9, CCR10 und CXCR2 wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den pDCs der Patienten mit Asthma und der Kontrollgruppe gefunden. Die pDCs von Patienten mit Asthma waren zu einem größeren Prozentsatz positiv für CCR9 (Median: A: 41,7 vs NP: 12,9;  $p=0,019$ ). Ebenso konnte CCR10 auf den pDCs der Patienten mit Asthma deutlich häufiger nachgewiesen werden (Median: A: 13,3 vs NP: 1,7;  $p=0,044$ ) (Abb. 3.2.9) und auch CXCR2 wurde von den pDCs der Patienten mit Asthma häufiger exprimiert (Median: A: 51,3 vs NP: 27,3;  $p=0,048$ ) (Abb. 3.2.10). CXCR3 wurde auf nahezu allen pDCs gefunden

## Resultate

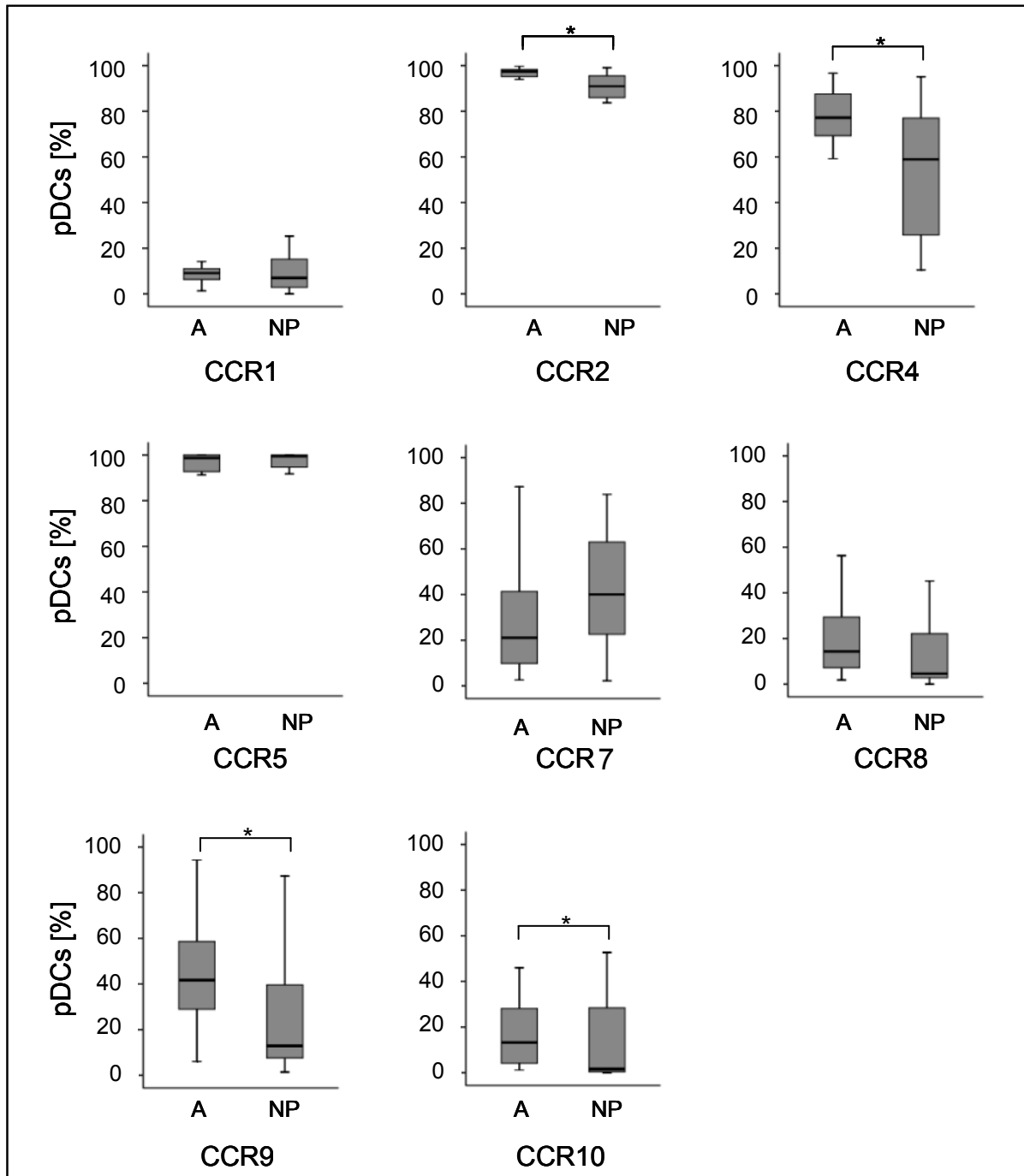
(Abb. 3.2.8). Deshalb wurde für die Beurteilung der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) herangezogen. Dabei wurde deutlich, dass pDCs aus der Gruppe der Patienten mit Asthma signifikant weniger CXCR3 auf ihrer Oberfläche exprimieren als die pDCs aus der Kontrollgruppe (Median: A: 222,5 vs NP: 298;  $p=0,002$ ) (Abb. 3.2.10).



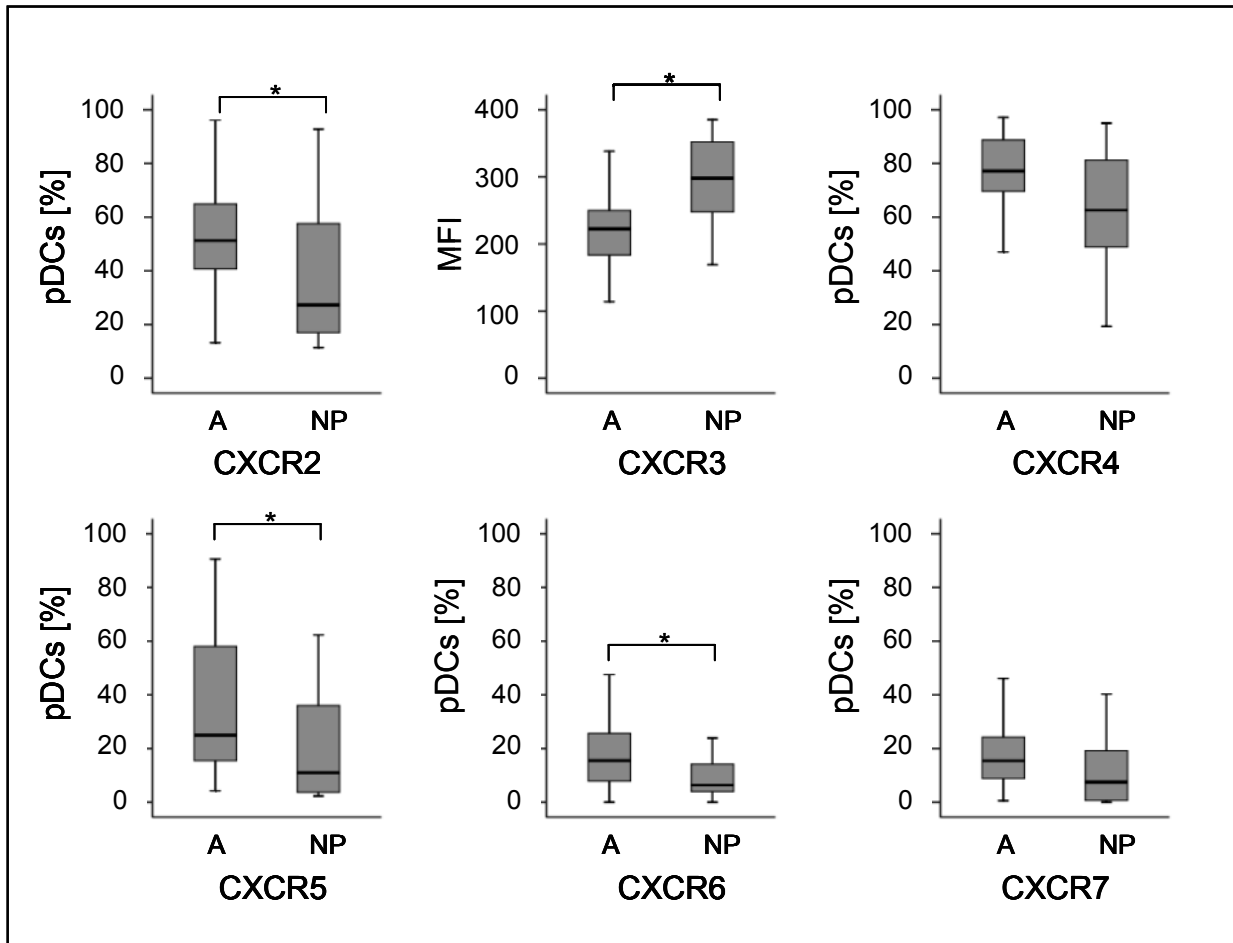
**Abb. 3.2.8: Exemplarische Darstellung der Chemokinrezeptoren CXCR1-7:** Vollblut wurde wie in Material und Methoden beschrieben behandelt. pDCs wurden als  $\text{lin}1^{-}/\text{HLA-DR}^{+}/\text{CD123}^{+}$  identifiziert. Die Histogramm-Plots stellen exemplarisch die Expression der Chemokinrezeptoren eines Probanden dar. Grau: IgG-Kontrolle, rot: Signal des spezifischen Antikörpers.

Im Gegensatz dazu wurde CXCR5 nur auf einem Teil der pDCs nachgewiesen, wobei aber die pDCs der Patienten mit Asthma signifikant häufiger positiv für den Rezeptor CXCR5 sind als die pDCs der Normalpersonen (Median: A: 25,0 vs NP: 11,0;  $p=0,048$ ) (Abb. 3.2.10). Ähnlich verhielt es sich mit dem Chemokinrezeptor CXCR6. Er war nur zu einem geringen Prozentsatz auf den pDCs nachweisbar, aber signifikant häufiger auf den pDCs der Patienten mit Asthma (Median: A: 15,5 vs NP: 6,4;  $p=0,030$ ) (Abb. 3.2.10). Zusammenfassend wurden die Chemokinrezeptoren, für die ein signifikanter Unterschied gefunden wurde, häufiger von den pDCs der Patienten mit Asthma exprimiert. Eine Ausnahme davon stellt lediglich die Expression des Rezeptors CXCR3 dar.

## Resultate



**Abb. 3.2.9: Expression der Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, CCR9 und CCR10.** In den Boxplots ist der prozentuale Anteil CCR1<sup>+</sup>, CCR2<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup>, CCR5<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>, CCR8<sup>+</sup>, CCR9<sup>+</sup> und CCR10<sup>+</sup> pDCs von Patienten mit Asthma (A) und Normalpersonen (NP) dargestellt. Die Berechnung von Signifikanzen zwischen den Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests.  $p < 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant definiert.

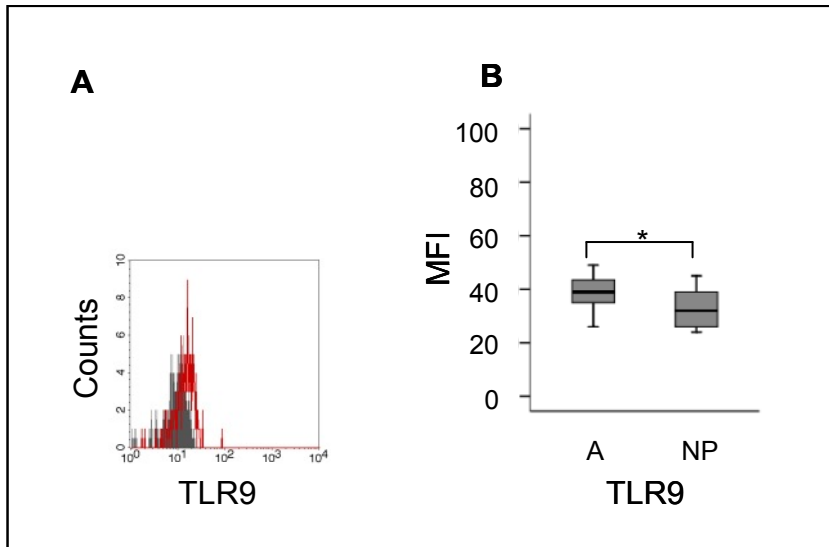


**Abb. 3.2.10: Expression der Chemokinrezeptoren CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6 und CXCR7.** In den Boxplots ist der prozentuale Anteil CXCR2<sup>+</sup>, CXCR4<sup>+</sup>, CXCR5<sup>+</sup>, CXCR6<sup>+</sup> und CXCR7<sup>+</sup> pDCs von Patienten mit Asthma (A) und Normalpersonen (NP) dargestellt. Zum Vergleich der Expression von CXCR3 wurde die mittlere Fluoreszenzintensität und nicht der prozentuale Anteil positiver pDCs herangezogen. Die Berechnung von Signifikanzen zwischen den Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests.  $p < 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant definiert.

### 3.2.5 Expression von TLR9

TLR9 ist ein endosomal lokalisierter Rezeptor, der unmethylierte CpG-reiche, virale und bakterielle DNA-Sequenzen erkennt. Die durchflußzytometrische Messung ergab eine signifikant stärkere Expression von TLR9 in pDCs von Patienten mit Asthma (Median: A: 39 vs NP: 32;  $p=0,039$ ) (Abb. 3.2.11).





**Abb. 3.2.11: Expression von TLR9 in pDCs.** **A:** Vollblut wurde wie in Material und Methoden beschrieben behandelt. pDCs wurden als  $\text{lin}1^{-}/\text{HLA-DR}^{+}/\text{CD123}^{+}$  identifiziert. Die Histogramm-Plots stellen exemplarisch die Expression von TLR9 im Cytoplasma der pDCs eines Probanden dar. Grau: IgG-Kontrolle, rot: Signal des spezifischen Antikörpers. **B:** In den Boxplots wird der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) der TLR9-positiven pDCs von Patienten mit Asthma (A) und Normalpersonen (NP) dargestellt. Die Berechnung von Signifikanzen zwischen den Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests.  $p < 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant definiert.

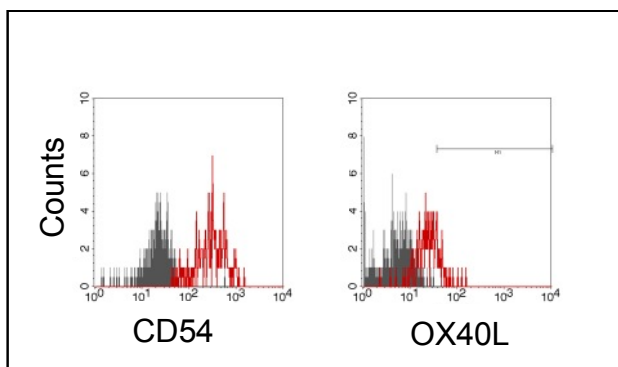
### 3.3 Auswirkungen einer saisonalen Behandlung mit inhalativen Kortikosteroiden auf pDCs

In die Studie wurden nur Probanden aufgenommen, die mindestens acht Wochen vor der Blutabnahme nicht mehr mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt wurden, um einen Einfluss der Medikation auf die pDCs möglichst auszuschließen. Die Gruppe der Patienten mit Asthma setzt sich aber aus einer Population zusammen, die bei saisonalen Beschwerden mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt werden und einer Population, die noch nie mit inhalativen Kortikosteroiden therapiert wurde. Um einen möglichen Langzeiteffekt der Behandlung mit inhalativen Kortikosteroiden nachzuweisen wurde die Gruppe der Patienten mit Asthma weiter unterteilt. Gruppe A beinhaltet nur Patienten mit Asthma, die noch nie mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt wurden und Gruppe CS schließt alle Patienten mit Asthma ein, die während akuter

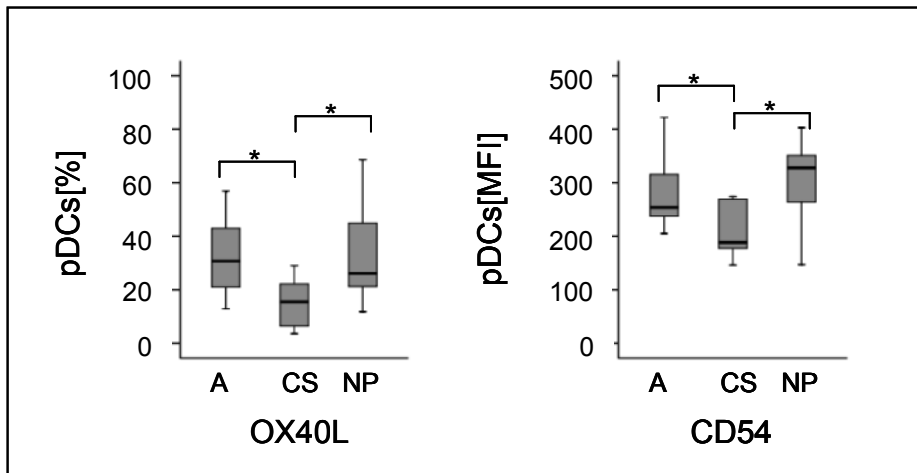
Krankheitsphasen mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt wurden. Von den insgesamt 20 eingeschlossenen Patienten mit Asthma waren 8 mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt worden (A: n=12; CS: n=8). Die Therapie wurde vor mindestens zwei und maximal vier Monaten beendet. Die Behandlungsdauer mit inhalativen Kortikosteroiden lag bei den Probanden aus der Gruppe der Patienten mit Asthma, die bei saisonalen Beschwerden mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt werden, zwischen zwei und 31 Jahren.

### 3.3.1 Expression von OX40L und CD54 in Abhängigkeit der Vorbehandlung mit inhalativen Kortikosteroiden

Die pDCs aus der Gruppe CS exprimierten im Vergleich mit den pDCs der beiden anderen Gruppen signifikant seltener den OX40-Ligand (Median: A: 30,7 vs CS: 15,5,  $p=0,012$ ; NP: 26,1 vs CS:15,5,  $p=0,013$ ) (Abb. 3.3.2). CD54 wurde dagegen von nahezu allen pDCs exprimiert, weshalb für die Beurteilung die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) herangezogen wurde (Abb. 3.3.1). Die pDCs der Gruppe der Patienten mit Asthma, die mit Kortikosteroiden behandelt wurden, exprimierten signifikant weniger CD54 auf ihrer Oberfläche als die pDCs aus den beiden anderen Gruppen (Median: A: 254 vs CS: 188,5,  $p=0,039$ ; NP: 328 vs CS: 188,5,  $p=0,003$ ) (Abb. 3.3.2).



**Abb. 3.3.1: Exemplarische Darstellung der Expression von CD54 und OX40L.** Vollblut wurde wie in Material und Methoden beschrieben behandelt. pDCs wurden als  $\text{lin1}^{\text{H}}/\text{HLA-DR}^{\text{H}}/\text{CD123}^{\text{H}}$  identifiziert. Die Histogramm-Plots stellen exemplarisch die Expression der Immunglobulinrezeptoren eines Probanden dar. Grau: IgG-Kontrolle, rot: Signal des spezifischen Antikörpers



**Abb. 3.3.2: Expression von OX40L und CD54.** In den Boxplots wird der prozentuale Anteil OX40L- und CD54-positiver pDCs von Patienten mit Asthma, die nicht mit Kortikosteroiden behandelt wurden (A), von Patienten mit Asthma die mit inhalativen Kortikosteroiden (CS) und von gesunden Probanden (NP) dargestellt. Die Berechnung von Signifikanzen zwischen den Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests.  $p < 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant definiert.

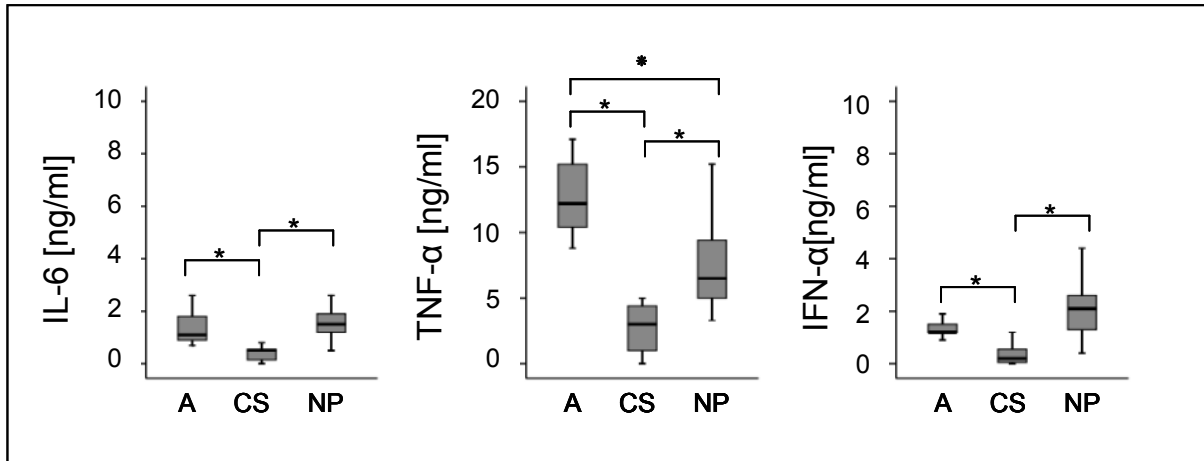
### 3.3.2 IL-6-, TNF- $\alpha$ - und IFN- $\alpha$ -Freisetzung nach Stimulation mit einem TLR9-Agonisten

Frisch isolierte pDCs wurden mit dem CpG-Oligonukleotid ODN2216 inkubiert, um anschließend im Überstand die Konzentration von IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\alpha$  zu messen. Bei der Auswertung dieser Ergebnisse wurde die Gruppe der Patienten mit Asthma wie oben beschrieben in zwei Subgruppen unterteilt. Die Gruppe A schließt alle Patienten mit Asthma ein, die nicht mit inhalativen Kortikosteroiden therapiert wurden. In der Gruppe CS befinden sich alle Patienten mit Asthma, die während aktiver Krankheitsphasen mit inhalativen Kortikosteroiden therapiert wurden.

In der Gruppe der Patienten mit Asthma, die mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt werden, waren die Konzentrationen der Cytokine IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\alpha$  im Überstand signifikant erniedrigt gegenüber der Gruppe der Patienten mit Asthma, die nie mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt wurden (IL-6: Median: A: 1,1ng/ml vs CS: 0,5 ng/ml,  $p=0,05$ ; TNF- $\alpha$ : Median: A: 12,2 ng/ml vs CS: 3,0 ng/ml,  $p=0,03$ ; IFN- $\alpha$ : Median: A: 1,25 $\mu$ g/ml vs CS: 0,5 $\mu$ g/ml). Auch im Vergleich mit der Gruppe der Normalpersonen war die Konzentration der untersuchten Cytokine in der Gruppe der Patienten mit Asthma, die mit inhalativen Steroiden vorbehandelten wurden, deutlich erniedrigt (IL-6: Median:

## Resultate

NP: 1,5 ng/ml vs CS: 0,5 ng/ml,  $p=0,001$ ; TNF- $\alpha$ : NP: 6,5 ng/ml vs CS: 3,0 ng/ml,  $p=0,002$ ; IFN- $\alpha$ : Median: NP: 2,1 $\mu$ g/ml vs CS: 0,5 $\mu$ g/ml,  $p=0,001$ ) (Abb. 3.3.3). Bei der Gegenüberstellung der beiden Gruppen, Asthma ohne CS und Normalpersonen, konnte bezüglich der Freisetzung von IL-6 und IFN- $\alpha$  kein Unterschied festgestellt werden. Dagegen war die Konzentration von TNF- $\alpha$  in der Gruppe Asthma ohne CS signifikant erhöht gegenüber der Gruppe der Normalpersonen (Median: A:12,2ng/ml vs NP:6,5ng/ml,  $p=0,19$ ). (Abb. 3.3.3).



**Abb. 3.3.3 Freisetzung von IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\alpha$  nach Stimulation mit dem TLR9-Agonisten ODN2216.** In den Boxplots wird die Konzentration der im Überstand der Zellkultur gemessenen Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\alpha$  in der Gruppe der Patienten mit Asthma, die nie mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt werden (A), der Gruppe der Patienten mit Asthma, die während saisonaler Beschwerden mit inhalativen Kortikosteroiden therapiert werden (CS) und der Kontrollgruppe (NP) dargestellt. Die Berechnung von Signifikanzen zwischen den Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests.  $p < 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant definiert.

## **4. Diskussion**

pDCs sind im peripheren Blut von Patienten mit Asthma vermehrt vorhanden (Uchida Y 2001, Matsuda H 2002) und auch am Ort einer akuten allergischen Inflammation werden sie in erhöhter Konzentration gefunden (Jahnsen FL 2000, Bangert C 2003, Bratke K 2006). Auf Grund dieser Beobachtungen wird vermutet, dass die pDCs an der Entstehung einer allergischen Entzündung beteiligt sind. Welche Rolle die pDCs bei der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiales spielen ist bis heute nicht genau bekannt. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass pDCs in der Lage sind die allergische Atemwegsentzündung und auch die Produktion von Th2-Cytokinen am Ort des allergischen Geschehens zu unterdrücken (deHeer H 2004, Kool M 2009). Die Stimulation von pDCs durch OX40L führt in vitro dagegen zur Induktion einer Th2-Differenzierung naiver T-Zellen (Ito T 2004) und es kommt abhängig davon, ob pDCs mit einem Th1- oder Th2-Mediator inkubiert werden, zur Auslösung einer T-Zell-Antwort in die eine oder andere Richtung (Schroeder JT 2005). pDCs die aus dem Blut von atopischen Patienten isoliert wurden, präsentieren nach der Stimulation mit IL-4 ein anderes Verhalten als pDCs, die aus dem Blut einer nicht atopischen Kontrollgruppe isoliert werden (Uchida Y 2001). Aus diesen Beobachtungen entstand die Hypothese, dass pDCs, durch das, bei einem asthmatischen Patienten vorherrschende Th2-Milieu, phänotypisch und funktionell verändert werden.

### **4.1 Phänotypische Veränderungen der pDCs im TH2-Milieu von Patienten mit Asthma**

#### **4.1.1 pDCs von Patienten mit Asthma befinden sich auf einem höheren Aktivierungsniveau**

Untersucht wurde unter anderem die Expression der costimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD83, CD86 und OX40L, die für die Aktivierung von T- und B-Lymphozyten von Bedeutung sind. CD40 ist ein Molekül aus der Familie der TNF-Rezeptoren, das als costimulatorisches Protein an der Induktion einer antigenspezifischen T- und B-Zellantwort beteiligt ist (Ma DY 2009). Auf unreifen DC ist CD40 nur gering exprimiert und wird im Zuge der Aktivierung hochreguliert. CD154 ist der Ligand, der an CD40 bindet. Eine Interaktion zwischen CD40 und seinem Liganden induziert die Reifung der dendritischen Zelle (Banchereau 2000) und führt zur vermehrten Expression der

costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, die ebenso wie CD40, als Markermoleküle für die Aktivierung der DCs gelten (Banchereau et Steinmann 1998). PDCs die in vitro in einem Th2-Milieu ausdifferenziert werden, exprimieren signifikant weniger CD40 als pDCs die in einem Th1-Milieu inkubiert werden (Bratke K 2011). Überraschenderweise sind die pDCs aus der Gruppe der Patienten mit Asthma in dieser Arbeit signifikant häufiger positiv für CD40. Im Modell der segmentalen Allergen-Provokation exprimiert ein Großteil der, mit Hilfe einer bronchoalveolären Lavage gewonnenen, endobronchialen pDCs CD40 (Bratke K 2007). Fasst man diese beiden Beobachtungen zusammen, scheint die in vitro gemessene Suppression von CD40 durch die Inkubation im Th2-Milieu, in vivo, durch bislang unbekannte Stimuli, aufgehoben zu sein oder die Expression von CD40, wie in dieser Arbeit gezeigt, sogar verstärkt zu werden.

Es konnte gezeigt werden, dass pDCs die durch Influenzaviren und CD40L stimuliert werden eine Th1-Immunantwort induzieren (Cella 2000). Eine Aktivierung der pDCs mittels CD40L ohne zusätzliche Stimulation durch ein Pathogen führt dagegen zur Sekretion von Cytokinen die typisch für eine TH2-Immunantwort sind (Bendriss-Vermare 2005). Die gehäufte Expression von CD40 auf pDCs aus der Gruppe der Patienten mit Asthma könnte demnach auf ein erhöhtes proinflammatorisches Potenzial der pDCs beim allergischen Asthma bronchiale hinweisen.

Für die Expression von CD86 auf pDCs konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden werden. Es zeichnete sich aber ein Trend ab, dass pDCs von Patienten mit Asthma häufiger CD86 exprimieren als pDCs von Normalpersonen. CD86 ist ein wichtiges costimulatorisches Molekül, das über CD28 an T-Zellen bindet und dadurch die Umwandlung naiver T-Zellen in Effektorzellen induziert (Ueno 2007). Im Zuge der Aktivierung einer dendritischen Zelle wird CD86 vermehrt exprimiert.

Sowohl CD40 als auch CD86 wird von unreifen pDCs nur gering exprimiert. Im Rahmen der Aktivierung der pDCs werden diese beiden Moleküle hochreguliert. Fasst man also zusammen, dass auf den pDCs signifikant häufiger CD40 und auch tendenziell häufiger CD86 exprimiert wird, könnte man darauf schließen, dass sich die pDCs im peripheren Blut eines Patienten mit Asthma auf einer höheren Reifungsstufe befinden.

#### **4.1.2 Die vermehrte Expression von Immunglobulinrezeptoren spiegelt das Th2-induzierende Potenzial der pDCs wider**

In dieser Arbeit wurde die Expression von IgG- sowie IgE-Rezeptoren auf der Oberfläche von pDCs vergleichend untersucht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte für den hochaffinen IgG-Rezeptor CD64 so wie bereits in der Literatur beschrieben für den hochaffinen IgE-Rezeptor Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  nachgewiesen werden (Foster B 2003).

CD64 ist ein Immunglobulinrezeptor, der mit hoher Affinität den Fc-Teil von IgG bindet. Über diesen Mechanismus sind pDCs in der Lage opsoniertes Antigen zu phagozytieren (Fanger NA 1997). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Mäuse, deren DCs keine Fc $\gamma$ RI-Kette exprimieren, eine geringere Hyperreagibilität und Entzündungsaktivität, verglichen mit Wildtypmäusen, entwickeln. Nachdem das Immundefizit der Fc $\gamma$ RI-defizienten Mäuse durch Substitution von Antigen-präsentierenden Zellen aus Wildtyp-Mäusen beseitigt wurde, zeigten diese Mäuse auch wieder eine vergleichbare bronchiale Hyperreagibilität im Rahmen einer Methacholintestung verglichen mit Wildtyp-Mäusen (Kitamura K 2007). Man kann deshalb davon ausgehen, dass der hochaffine Fc $\gamma$ -Rezeptor in der Phase der Sensibilisierung und Etablierung der asthmatischen Reaktion, zumindest im Tiermodell essenziell ist. Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass bei Atopikern neben den allergenspezifischen IgE-Molekülen auch IgG-Moleküle gegen die gleichen Allergene nachweisbar sind (Bandukwala HS 2007) und dass die IgG-Konzentration mit der Konzentration der IgE-Antikörper im Serum korreliert (Johansson C 2004). In dieser Arbeit wurde CD64 signifikant häufiger auf pDCs von Patienten mit Asthma nachgewiesen. Überträgt man die Ergebnisse aus dem Tiermodell auf den Menschen könnte man den CD64-positiven pDCs einen proinflammatorischen Effekt bei der allergischen Entzündung zuschreiben. Die IgG-Spiegel der Patienten mit Asthma gegen das sensibilisierte Antigen wurden nicht gemessen. Es kann deshalb keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Korrelation zwischen der IgG-Konzentration und der Expression von CD64 besteht. Welche Rolle spezifische IgGs und deren Rezeptor bei der Pathogenese asthmatischer Entzündungen spielen, kann aus der reinen Beobachtung, dass pDCs von Patienten mit Asthma vermehrt CD64 exprimieren nicht vorhergesagt werden. Es liefert aber einen Hinweis dass spezifisches IgG auch beim Menschen an der Entstehung einer bronchialen Hyperreagibilität beteiligt sein könnte. Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  bezeichnet die  $\alpha$ -Kette des hochaffinen IgE-Rezeptors, der sich auf der Zelloberfläche verschiedener Immunzellen befindet. Über Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  wird freies IgE an der

Zelloberfläche gebunden. Mit Hilfe des rezeptorgebundenen IgEs werden spezifische Antigene erkannt und internalisiert. Bei mDCs konnte gezeigt werden, dass das in die Zelle aufgenommene Antigen in Fragmente gespalten wird, die dann mit Hilfe von MHC-Molekülen wieder auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Maurer D 1998). Die Expression des IgE-Rezeptors auf der Oberfläche der pDCs korreliert mit der IgE-Konzentration im Serum der Probanden (Foster B 2003). FcεRIα konnte auf nahezu allen pDCs aus der Gruppe der Patienten mit Asthma nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe waren dagegen nur 58% der pDCs positiv für FcεRIα. Diese Beobachtung ist kongruent mit den Ergebnissen früherer Studien (Foster B 2003, Tversky JR 2008, Gill MA 2010).

Die Expression des IgG-Rezeptors ist für die Auslösung einer bronchialen Hyperreagibilität im Tiermodell essenziell (Kitamura K 2007) und die IgE-Kreuzvernetzung führt zu einer vermehrten Sekretion von IL-4, einem Th2-typischen Interleukin und zur verringerten Freisetzung von IFN-α, einem Th1-induzierenden Cytokin (Novak N 2004). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass pDCs von Asthmatikern vermehrt CD64 und FcεRIα exprimieren. Diese Beobachtung könnte deshalb einen Hinweis dafür liefern, dass die pDCs beim Patienten mit Asthma an der allergischen Entzündung beteiligt sind.

### 4.1.3 TLR9

TLR9 gehört zur Familie der sogenannten Toll-like Rezeptoren. Mit Hilfe dieser Rezeptoren können Immunzellen unterschiedliche molekulare Muster von Pathogenen erkennen. TLR9 ist beispielsweise der Rezeptor für CpG-Motive. Tritt eine plasmacytoide dendritische Zelle über TLR9 mit einem Pathogen in Kontakt, kommt es zur Ausschüttung großer Mengen IFN-α und zur Induktion einer Th1-Immunantwort, die zum Ziel hat, die Invasion des Pathogens einzudämmen (Cella M 2000, Colonna 2004).

In vitro konnte gezeigt werden, dass es durch die Kreuzvernetzung des IgE-Rezeptors FcεRIα auf der Zelloberfläche der DCs zu einer reduzierten Expression von TLR9 im Cytoplasma kommt. Die verringerte Expression von TLR9 korreliert in vitro mit einer reduzierten Sekretion von IFN-α als Antwort auf die Stimulation mit dem TLR9-Agonisten CpG-ODN (Schroeder JT 2005, Gill MA 2010). Überraschenderweise konnte in dieser Arbeit, trotz der deutlich erhöhten Expression von FcεRIα, ebenfalls ein leichter Anstieg der TLR9-Expression in den pDCs der Patienten mit Asthma gezeigt werden. In



in vitro führt die Stimulation der pDCs durch Kreuzvernetzung der IgE-Antikörper nicht nur zu einer verringerten Expression von TLR9 sondern auch zur Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-6. Durch Zugabe eines neutralisierenden TNF- $\alpha$ -Antikörpers wird TLR9 wieder verstärkt auf pDCs exprimiert, so dass der autokrinen TNF- $\alpha$ -Sekretion eine wichtige Bedeutung bei der Regulation der TLR9-Expression zugeschrieben wird (Schroeder JT 2008). Da sich die Patienten mit Asthma in dieser Studie in einem symptomfreien Intervall befanden, ist nicht davon auszugehen dass die pDCs über eine Kreuzvernetzung von Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  auf der Oberfläche TNF- $\alpha$  sezernieren. Möglicherweise könnte das die gleichzeitige starke Expression von TLR9 und Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  durch die pDCs der Patienten mit Asthma erklären.

Die Expression von TLR9 durch pDCs wurde auch bei anderen allergischen Erkrankungen untersucht. Bei Patienten mit allergischer Rhinitis ist die Expression von TLR9 in pDCs im Vergleich zu gesunden Normalpersonen nicht verändert (Tversky JR2008), wohingegen pDCs von Patienten mit einer Allergie gegen Hymenopteren-Gift eine erniedrigte Expression von TLR9 zeigen (Dreschler K 2011). Die vermehrte Expression von TLR9 durch pDCs scheint deshalb eher mit einem allergischen Asthma bronchiale assoziiert zu sein und nicht mit allergischen Erkrankungen im Allgemeinen.

### **4.1.4 Adhäsionsmoleküle: pDCs exprimieren CD11a, CD18 und CD62L**

Nahezu alle pDCs waren positiv für CD11a und CD18, weshalb für die Auswertung der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) herangezogen wurde. CD11a und CD18 bilden zusammen einen Komplex der als Integrin bezeichnet wird. Integrine sind Transmembran-Proteine die für die Verbindung zwischen Zellen und der Extrazellulärmatrix sowie für die Signalübermittlung zwischen Zellen verantwortlich sind (Kellersch B 2006). CD11b, welches auf anderen Zellen auch mit CD18 komplexiert konnte dagegen auf den pDCs nicht nachgewiesen werden. Die pDCs der Patienten mit Asthma und der gesunden Kontrollgruppe unterschieden sich nicht bezüglich der Expression von CD11a oder CD18.

Das Molekül CD62L, das auch als L-Selektin bezeichnet wird, vermittelt das Entlangrollen von Leukozyten an Endothelzellen. Sein korrespondierender Ligand PNAd befindet sich vor allem auf dem Epithel der hochendothelialen Venulen in den T-Zonen der Lymphknoten (McKenna 2005). Im Mausmodell der Kontaktsensibilisierung scheint CD62L für die Auslösung einer Th2-dominierten Immunantwort von Bedeutung zu sein. (Ogawa A 2010). In dieser Studie zeigten die pDCs aus der Gruppe der Patienten mit

Asthma eine verstärkte Expression von CD62L was einen weiteren Hinweis für das Th2-stimulierende Potential der pDCs bei Patienten mit Asthma liefern könnte.

### **4.1.5 PDCs von Patienten mit Asthma sind mit Chemokinrezeptoren ausgestattet, die eine Migration in entzündetes Gewebe ermöglichen**

Durch das Zusammenspiel von Chemokingradienten und den dazugehörigen Rezeptoren können sich dendritische Zellen ihren Weg in ein Organ bahnen oder aus einem Organ in die regionären Lymphknoten auswandern. In dieser Arbeit sind die pDCs beider Gruppen positiv für CCR5, der als Rezeptor für die Chemokine CCL5 und CCL3, die beide in den Atemwegen synthetisiert werden, dient (Vermaelen K 2005). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht für die Expression von CCR5 nicht. Diese Beobachtung passt zu der Tatsache dass pDCs kontinuierlich, auch unter steady-state Bedingungen in die Lunge auswandern, um das Eindringen pathogener Keime zu überwachen (Vermaelen KY 2001; Holt PG 1994).

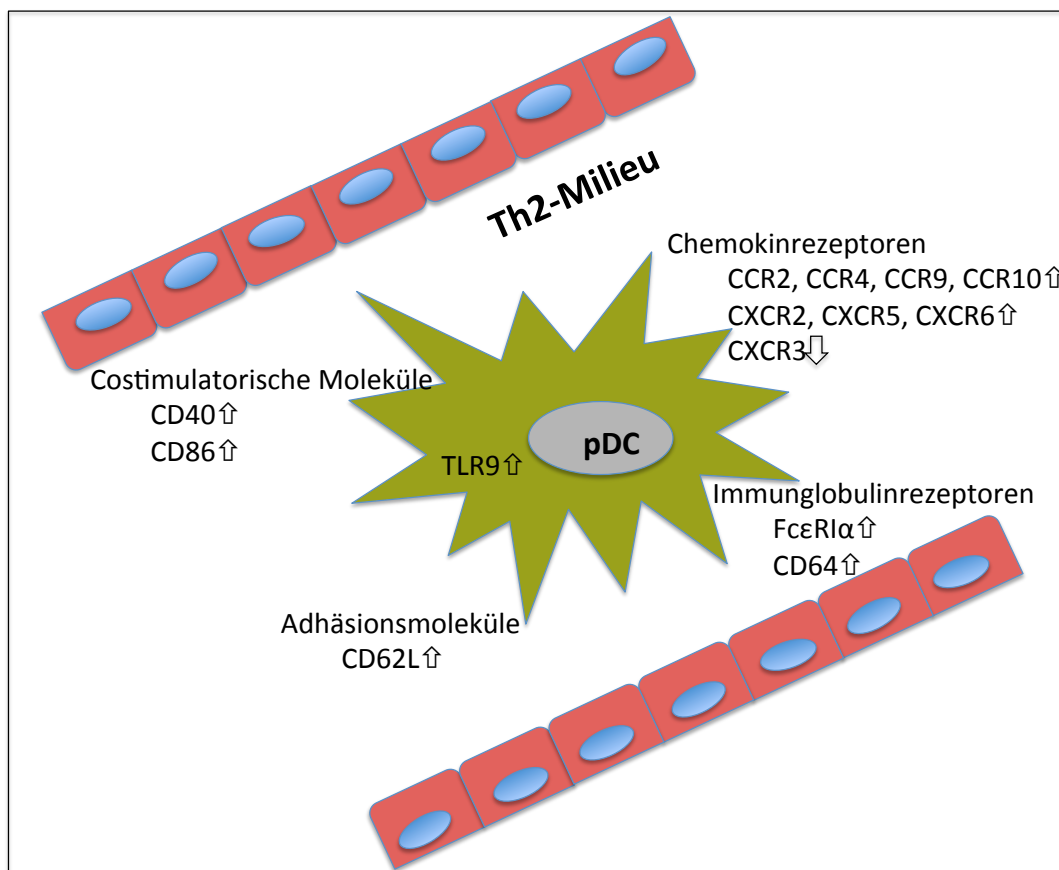
Zwischen den beiden Gruppen der Patienten mit Asthma und gesunden Normalpersonen konnten folgende Unterschiede bezüglich der Expression von Chemokinrezeptoren nachgewiesen werden: CCR2 wurde von den pDCs der Patienten mit Asthma deutlich häufiger exprimiert. Im Mausmodell konnte gezeigt werden dass die Akkumulation von mDCs in der allergisch entzündeten Lunge direkt über CCR2 kontrolliert wird (Robays 2007) und dass CCR2 ein wichtiger Rezeptor ist, mit dessen Hilfe Th2-induzierende mDCs nach Allergenkontakt in die Lunge auswandern. (Vermaelen und Pauwels 2005). Beim Menschen wurde der Ligand CCL2 in der Flüssigkeit der bronchoalveolären Lavage bei Patienten mit Asthma in höheren Konzentrationen gemessen als bei den Probanden der gesunden Kontrollgruppe (Alam R 1996). Auch die Chemokinrezeptoren CCR4, CXCR2, CXCR5 und CXCR6 wurden von den pDCs der Patienten mit Asthma signifikant häufiger exprimiert. CXCL5 ist der Ligand für den Rezeptor CXCR2. Im Lungengewebe von asthmatischen Patienten sind die inflammatorischen Zellen sowohl für den Ligand CXCL5 als auch für den Rezeptor CXCR2 häufiger positiv (Qiu Y 2007). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass im Lungengewebe von OVA-sensibilisierten Mäusen nach einer Allergenbelastung, die Konzentration der mRNA des CXCR5-Liganden CXCL13 erhöht ist und der Rezeptor CXCR5 vermehrt nachgewiesen werden kann. Auch in der BAL beim Menschen werden bei Patienten mit Asthma erhöhte Konzentrationen von CXCL13 gemessen (Baay-Guzman GJ 2012). CXCR6 ist der Rezeptor für CXCL16. Dieses Chemokin wird von

Alveolarmakrophagen sezerniert und ist in relativ hohen Konzentrationen in der BAL von Gesunden und Patienten mit Asthma vorhanden (Morgan AJ 2005). CCL17 stellt den Liganden für CCR4 dar und wird von den Epithelzellen von Patienten mit Asthma nach Allergenkontakt vermehrt sezerniert. (Vijayanand P 2010). Es konnte gezeigt werden dass CCR4 eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Th2-Zellen in die Lunge spielt (Vijayanand P 2010), so dass die erhöhte Expression von CCR4 auf den pDCs der Patienten mit Asthma ein stärkeres migratorisches Potenzial der pDCs in die Lunge widerspiegeln könnte. Fasst man zusammen dass die pDCs der Patienten mit Asthma die Rezeptoren CCR2, CCR4, CXCR2, CXCR5 und CXCR6 signifikant häufiger exprimieren, könnte man schlussfolgern, dass die pDCs der Patienten mit Asthma eine besondere Affinität zur Lunge aufweisen und dass sie in der Lage sind, im Falle eines Allergenkontakts rasch in die Lunge auszuwandern.

Neben den oben genannten Chemokinrezeptoren, die vor allem eine Einwanderung von Immunzellen in die Lunge hervorrufen, konnten auf den pDCs aus der Gruppe der Patienten mit Asthma auch Chemokinrezeptoren verstärkt nachgewiesen werden, die charakteristischerweise eine Chemotaxis in andere Organe als die Lunge auslösen. CCR9 ist der Rezeptor für das Darm-assoziierte Chemokin CCL25 (Mora JR 2003; Wendland M 2007) und für CCL27, das vor allem in der Haut vorkommt. Auch CCR10 ist ein Rezeptor für CCL27 und dirigiert Zellen ebenso in das Organ Haut. Diese Ergebnisse untermauern die klinische Beobachtung, dass allergisches Asthma bronchiale keine isolierte Erkrankung der Lunge ist. Vielmehr ist davon auszugehen dass eine Allergie immer als Systemerkrankung zu sehen ist und die Organe, die mit den Allergenen in Kontakt kommen unterschiedlich stark betroffen sind. Die Assoziation verschiedener atopischer Erkrankungen ist unumstritten. Im Laufe des Lebens kommt es bei Patienten mit atopischer Diathese häufig zum sogenannten Etagenwechsel der allergischen Erkrankung. Damit wird die klinische Beobachtung umschrieben, dass sich aus einer allergischen Rhinitis im Laufe der Zeit ein allergisches Asthma bronchiale entwickeln kann oder dass zusätzlich zu einer Lebensmittelallergie ein allergisch bedingtes Asthma bronchiale auftritt (Liu AH 2010). Dieses Phänomen wird auch als „allergischer Marsch“ bezeichnet (Punekar YS 2009).

Für den Chemokinrezeptor CCR9 konnte auch gezeigt werden, dass er sogenannte toleranzinduzierende pDCs definiert (Hadeiba H 2008). Die vermehrte Expression von CCR9 könnte darauf hinweisen dass pDCs von Patienten mit Asthma über ein größeres toleranzinduzierendes Potenzial verfügen.

Der Chemokinrezeptor CXCR3 wurde auf allen pDCs exprimiert, weshalb für die Beurteilung der Median der Fluoreszenzintensität herangezogen wurde. Es zeigte sich eine signifikant geringere Expression von CXCR3 durch die pDCs aus der Gruppe der Patienten mit Asthma. Neben CXCR3 wurde auch der Chemokinrezeptor CCR7 von den pDCs der Patienten mit Asthma tendenziell seltener exprimiert. Für CCR7 war der Unterschied aber nicht signifikant. Mit Hilfe von CXCR3 können pDCs aus dem Blut in die T-Zell-Zonen der Lymphknoten auswandern (Cella 1999) und CCR7 vermittelt die Migration in die Lymphknoten über die hochendothelialen Venulen (Vermaelen et Pauwels 2005; Seth S 2011). Das migratorische Potenzial der pDCs von Patienten mit Asthma in die Lymphknoten scheint somit reduziert zu sein. (Abb 4.1.1)



**Abb 4.1.1 Phänotypische Veränderungen der pDCs im Th2-Milieu der Patienten mit Asthma.** pDCs die aus dem peripheren Blut von Patienten mit Asthma gewonnen werden, zeigen eine vermehrte Expression der costimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 (nur Trend), der Immunglobulinrezeptoren FcεRIα und CD64, des Adhäsionsmoleküls CD62L und der Chemokinrezeptoren die eine Migration in entzündetes Gewebe vermitteln. Erniedrigt ist dagegen die Expression des Chemokinrezeptors CXCR3, der die pDCs in die Lymphknoten lenkt.

## **4.2 Mögliche Langzeiteffekte von inhalativen Glukokortikoiden auf pDCs im Blut**

### **4.2.1 Antiinflammatorische Effekte durch Suppression von OX40L und CD54**

Inhalative Glukokortikoide stellen einen der Grundpfeiler der Asthmatherapie dar. Es konnte gezeigt werden dass pDCs, die mit hohen Dosen Glukokortikoiden inkubiert werden, zur Apoptose angeregt werden (Boor PP 2006). In einer niedrigen Dosierung bewirken Glukokortikoide eine Reduktion der TLR-induzierten Funktion von pDCs (Boor PP 2006). PDCs von Patienten, die mit Glukokortikoiden behandelt wurden, setzten nach Inkubation mit Herpes Viren in vitro deutlich weniger IFN- $\alpha$  frei. Die Fähigkeit IFN- $\alpha$  zu sezernieren normalisierte sich aber innerhalb weniger Tage nach dem die Probanden nicht mehr mit Glukokortikoiden behandelt wurden (Shodell M 2001). In dieser Arbeit fiel auf, dass die Ausstattung der pDCs mit Oberflächenrezeptoren auch noch mehr als acht Wochen nach der letzten Kortikosteroid-Dosis verändert ist. In der Gruppe der Patienten mit Asthma, die bei saisonalen Beschwerden mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt wurden, zeigte sich eine verringerte Expression von OX40L und CD54 (Abb 4.2.1).

OX40L polarisiert die Differenzierung von T-Helfer Zellen in Richtung Th2 (Flynn S 1998) und inhibiert gleichzeitig die Sekretion von IL-10 durch Tregs (Ito T 2006), weshalb diesem Molekül eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung einer allergischen Inflammation zugeschrieben wird. In dieser Studie wurde OX40L auch nach einer kortikosteroidfreien Phase von mindestens zwei Monaten auf den pDCs aus der Gruppe der Patienten mit Asthma, die bei saisonalen Beschwerden mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt werden deutlich geringer exprimiert als auf den pDCs aus der Gruppe der Normalpersonen und der Gruppe der Patienten mit Asthma die nicht mit Kortikosteroiden therapiert wurden. Ein möglicher Mechanismus der antiallergischen, antiinflammatorischen Wirkung der inhalativen Kortikosteroiden könnte demnach auf der Suppression der OX40L-Expression auf pDCs beruhen.

Auch CD54, das auch als ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1) bezeichnet wird, ist auf pDCs von Patienten mit Asthma, die in der Vorgeschichte mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt wurden schwächer exprimiert. CD54 vermittelt das Auswandern von Leukozyten aus Blutgefäßen in entzündetes Gewebe und kann zusätzlich die Aktivierung von T-Lymphozyten vermitteln. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD54 auf myeloiden dendritischen

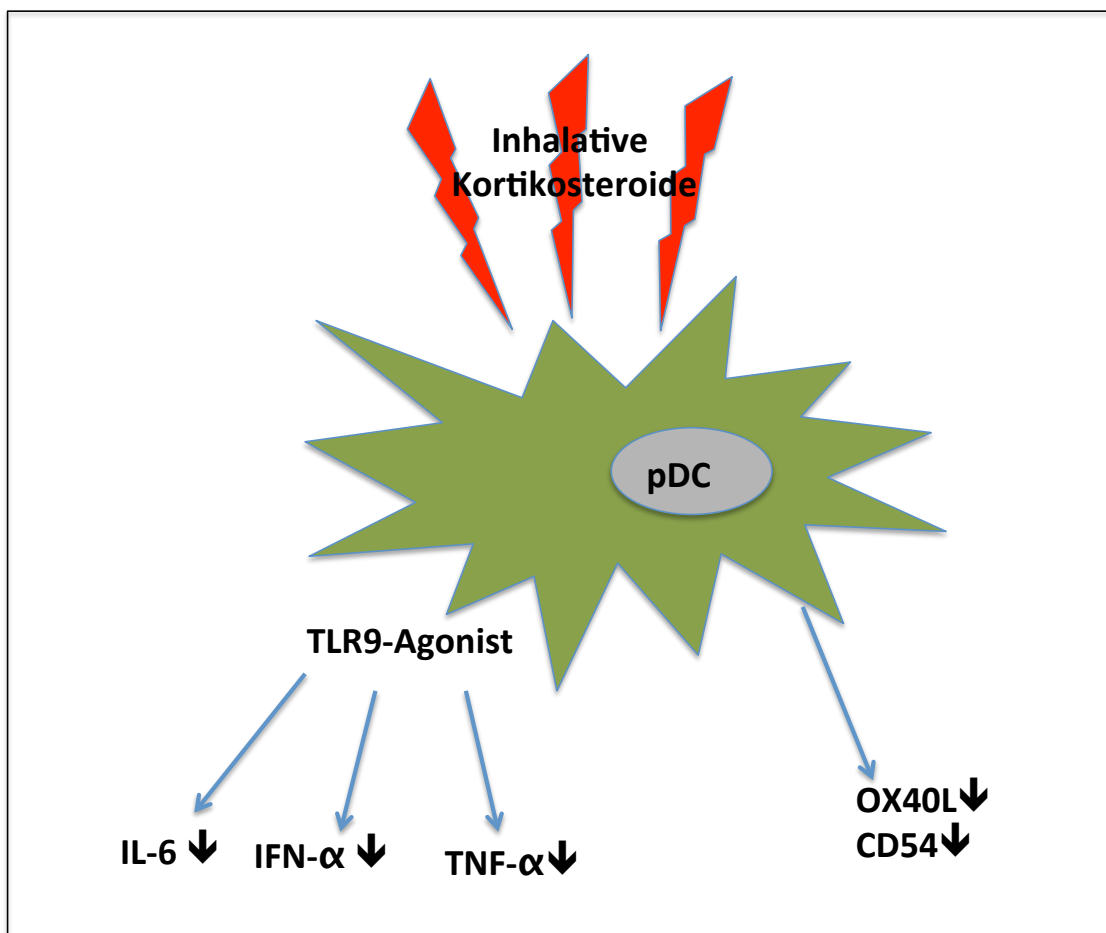
Zellen, Bronchialepithelzellen und Fibroblasten der Lunge durch die Inkubation mit Budesonid, Mometason oder Dexamethason verringert wird (Paolieri F 1997, Pan J 2001, Sabatini F 2003). Einen ähnlichen Effekt scheinen Kortikosteroide auch auf pDCs zu haben. Durch die Behandlung mit Kortikosteroiden nimmt die erhöhte Zahl der mDCs im allergisch entzündeten Gewebe ab (Moller GM 1996). Die Herunterregulation von CD54 ist möglicherweise mitverantwortlich für diesen Effekt. Es ist allerdings auch denkbar das die phänotypischen Veränderungen auf den pDCs der Patienten mit Asthma, die mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt wurden, nicht auf die Wirkung der Kortikosteroide sondern auf eine schwerere Form des Asthma bronchiales zurückzuführen sind.

### **4.2.2 Reduktion der TLR9 vermittelten Zytokinsekretion**

Analog zu den beschriebenen phänotypischen Veränderungen, konnten auch funktionelle Unterschiede zwischen den drei Gruppen nachgewiesen werden. PDCs aus der CS-Gruppe sezernierten nach Stimulation mit einem TLR9-Agonisten signifikant weniger IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 als die pDCs aus der Gruppe der Patienten mit Asthma, die nicht mit Kortikosteroiden behandelt wurden und die pDCs aus der Kontrollgruppe. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch die orale Gabe von Kortikosteroiden die INF-Sekretion der pDCs nach Stimulation mit einem TLR-Agonisten gehemmt wird. Wenige Tage nach dem Absetzen der Kortikosteroide normalisierte sich das sekretorische Potential der pDCs wieder (Boor PP 2006, Shodell M 2001). Erstaunlich ist, dass die Probanden in dieser Studie seit mindestens acht Wochen nicht mehr mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt wurden, aber immer noch signifikante Unterschiede nachgewiesen werden können. Für diese Beobachtung sind mehrere Erklärungsversuche denkbar. In der oben genannten Studie wurden die Patienten mit Asthma mit oralen Kortikosteroiden behandelt, wohingegen die Probanden dieser Arbeit mit inhalativen Steroiden therapiert wurden. Abhängig vom Applikationsweg werden unterschiedliche Steroid-Derivate verwendet. Möglicherweise werden abhängig vom Derivat verschiedene Langzeiteffekte hervorgerufen. Andererseits leiden die Probanden der Gruppe der Patienten mit Asthma die saisonal mit Kortikosteroiden behandelt wurden, eine leitliniengerechte Behandlung vorausgesetzt, definitionsgemäß an einem schwereren Asthma bronchiale als die Gruppe der Patienten mit Asthma die ausschließlich mit Betasympathomimetika und Mastzellstabilisatoren behandelt werden. Es ist deshalb denkbar, dass die pDCs auf Grund der schwereren Erkrankung

derart verändert sind, dass sie über ein eingeschränktes sekretorisches Potenzial bezüglich der Freisetzung von IFN- $\alpha$  und IL-6 verfügen. Inwieweit es durch diese Einschränkung der Freisetzung von Zytokinen durch pDCs zu einer systemischen Immunsuppression kommt, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Auch wenn diese Ergebnisse auf Grund der relativ geringen Anzahl an Probanden nur eingeschränkt beurteilbar sind, ist eine systemische Wirkung der topisch verabreichten Kortikosteroide nicht auszuschließen. In den drei untersuchten Gruppen wurde keiner der Probanden mit systemischen Kortikosteroiden therapiert. Ob die im peripheren Blut nachweisbaren Veränderungen durch die topisch angewendeten Kortikosteroide verursacht werden kann durch die Beobachtungen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Für die Durchführung weiterer Studien sollte aber bedacht werden, dass ein Einfluß von inhalativen Kortikosteroiden auf das Verhalten von pDCs auch Wochen nach der letzten Dosis nicht ausgeschlossen werden kann.



**Abb 4.2.1 Mögliche Langzeiteffekte von inhalativen Kortikosteroiden auf pDCs.** pDCs aus dem peripheren Blut von Patienten mit Asthma die während symptomatischer Episoden mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt wurden, sezernieren in vitro nach Stimulation mit einem TLR9-Agonisten signifikant weniger IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\alpha$  und sie exprimieren weniger CD54 und OX40L

### Zusammenfassung

Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege die durch eine anfallsartig auftretende Luftnot gekennzeichnet ist. Auf Grund einer bronchialen Hyperreagibilität kommt es zu rezidivierenden Obstruktionen der Atemwege. Beim allergischen Asthma bronchiale wird die Obstruktion durch die Inhalation eines spezifischen Antigens ausgelöst. Plasmacytoide dendritische Zellen werden sowohl am Ort des allergischen Geschehens als auch im Blut von Patienten mit Asthma in erhöhten Konzentrationen gefunden. Aus in vitro Untersuchungen ist bekannt, dass pDCs, die in einem TH2-Milieu inkubiert werden in ihrem Sekretionsverhalten verändert sind. Inwieweit das bei Patienten mit Asthma vorherrschende Th2-Milieu die pDCs in vivo phänotypisch und funktionell verändert und welche Rolle die pDCs beim Asthma bronchiale spielen ist nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurden die pDCs aus dem Vollblut mit Hilfe der Durchflusscytometrie ausführlich phänotypisch charakterisiert. Es zeigte sich, dass sich die pDCs die im Th2-Milieu der Patienten mit Asthma differenzieren auf einem höheren Aktivierungsniveau befinden. Dies spiegelt sich in der vermehrten Expression von CD40, CD62L und TLR9 wider. Das Muster der Chemokinrezeptoren der pDCs von Patienten mit Asthma ist derart verändert, dass sie bevorzugt in entzündetes Gewebe auswandern können. Sie exprimieren vermehrt CCR2, CXCR2, CXCR5 und CXCR6, wodurch eine Chemotaxis in die allergisch entzündete Lunge vermittelt wird sowie CCR4, CCR9 und CCR10, die zu einem Auswandern in die Haut und den Darm führen. Die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR7, die eine Chemotaxis in die regionären Lymphknoten vermitteln sind dagegen auf den pDCs der Patienten mit Asthma verringert. Wie schon in früheren Studien konnte auch im Rahmen dieser Arbeit eine vermehrte Expression des IgE-Rezeptors FcεRIα auf den pDCs von Patienten mit Asthma nachgewiesen werden. Neu ist, dass auch der IgG-Rezeptor CD64 vermehrt exprimiert wird. Zusammengefasst scheinen die pDCs der Patienten mit Asthma durch das Th2-Milieu derart verändert zu sein, dass sie die chronische Entzündung unterhalten können und über ein erhöhtes Th2-stimulatorisches Potenzial verfügen.

Überraschenderweise konnten in der Gruppe der Patienten mit Asthma, die während saisonaler Beschwerden mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt wurden, auch nach



## Zusammenfassung

mindesten zwei monatiger Therapiepause Unterschiede gegenüber den Patienten mit Asthma ohne ICS und den Normalpersonen gefunden werden. CD54 und OX40L wurden von pDCs der ICS-Gruppe seltener exprimiert und auch die Sekretion von IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\alpha$  nach Stimulation mit einem TLR9-Agonisten war eingeschränkt.

Zusammenfassend wird die Hypothese bestätigt dass pDCs im Blut von Patienten mit Asthma phänotypische Unterschiede aufweisen. Inwieweit die Veränderungen auf ein, bei Patienten mit Asthma vorherrschendes Th2-Milieu zurückzuführen sind, oder ob andere Faktoren ursächlich sind, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Sie liefert aber weitere Hinweise, die auf ein erhöhtes inflammatorisches, Th2-induzierendes Potenzial der pDCs bei Patienten mit Asthma hindeuten. Außerdem konnte gezeigt werden dass eine inhalative Therapie mit Kortikosteroiden möglicherweise zu immunsuppressiven Langzeiteffekten bei pDCs führt.

## Literaturverzeichnis

Anderson SD. Indirect challenge tests: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest*. 2010; 138: 25 - 30

Baay-Guzman GJ, Huerta-Yepez S, Vega MI, Aguilar-Leon D, Campillos M, Blake J, Benes V, et al. Role of CXCL13 in allergic airway inflammation: novel therapeutic target. *Chest* 2012; 141: 886 - 894

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245 – 252

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18: 767 – 811

Bandukwala HS, Clay BS, Tong J, Mody PD, Cannon JL, Shilling RA, Verbeek JS, Weinstock JV, Solway J, Sperling AI. Signaling through Fc gamma RIII is required for optimal T helper type (Th)2 responses and Th2-mediated airway inflammation. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 1875 - 1889

Bangert C, Friedl J, Stary G, Stingl G, Kopp T. Immunopathologic features of allergic contact dermatitis in humans: participation of plasmacytoid dendritic cells in the pathogenesis of the disease? *J. Invest. Dermatol.* 2003, 121: 1409 – 1418

Bendriss-Vermare N, Burg S, Kanzler H, Chaperot L, Duhon T, de Bouteiller O, D'Agostini M, et al. Virus overrides the propensity of human CD40L-activated plasmacytoid dendritic cells to produce Th2 mediators through synergistic induction of IFN-gamma and Th1 chemokine production. *J. Leukoc. Biol.* 2005; 78: 954 – 966

Beyer M, Bartz H, Horner K, Doths S, Koerner-Rettberg C, Schwarze J. Sustained increases in numbers of pulmonary dendritic cells after respiratory syncytial virus infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 113: 127 – 133

Blom B, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 1785 – 1796

Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M, Crain C, Trinchieri G, Liu YJ, O'Garra A. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential Toll-like receptor ligation. *J. Exp. Med.* 2003; 197: 101 – 109

Boor PPC, Metselaar HJ, Mancham S, Tilanus HW, Kusters JG, Kwekkeboom J. Prednisolone suppresses the function and promotes apoptosis of plasmacytoid dendritic cells. *Am. J. Transplant.* 2006; 6: 2332 – 2341

Bratke K, Lommatzsch M, Julius P, Kuepper M, Kleine HD, Luttmann W, Christian Virchow J. Dendritic cell subsets in human bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge. *Thorax* 2006; 62: 168 – 175

Bratke K, Lommatzsch M, Julius P, Kuepper M, Kleine HD, Luttmann W, Virchow JC. Dendritic cell subsets in human bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge. *Thorax* 2007; 62: 168 - 175

Bratke K, Klein C, Kuepper M, Lommatzsch M, Virchow JC. Differential development of plasmacytoid dendritic cells in Th1- and Th2-like cytokine milieus. *Allergy* 2011; 66: 386 - 395

Buhl R, Berdel D, Criée CP, Gillisen A, Kardos P, Kroegel C, Leupold W, Lindemann H, Magnussen H, Nowak D, Pfeiffer-Kascha D, Rabe K, Rolke M, Schultze-Werninghaus G, Sitter H, Ukena D, Vogelmeier C, Welte T, Wettengel R, Worth H. Guidelines for diagnosis and treatment of asthma patients. *Pneumologie* 2006; 60: 139 – 177

Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med.* 2001 ; 344: 350 – 62

Charbonnier AS, Hammad H, Gosset P, Stewart GA, Alkan S, Tonnel AB, Pestel J Der p 1-pulsed myeloid and plasmacytoid dendritic cells from house dust mite-sensitized allergic patients dysregulate the T cell response. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 91 – 99

Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent Th1 polarization. *Nat. Immunol.* 2000; 1: 305 – 310

Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; 5: 919 - 923.

Cochand L, Isler P, Songeon F, Nicod LP, human lung dendritic cells have an immature phenotype with efficient mannose receptors. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1999; 21: 547 – 554

Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* 2004; 5: 1219 - 1226

DeHeer HJ, Hammad H, Soullie T, Hijdra D, Vos N, Willart MA et al. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J. Exp. Med.* 2004; 200: 89 – 98

Donnenberg VS, Donnenberg AD. Identification, rare-event detection and analysis of dendritic cell subsets in broncho-alveolar fluid and peripheral blood by flow cytometry. *Front. Biosci.* 2003; 8: 1175 – 1180

Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinmann RM, Nussenzweig MC. Dendritic Cells induce peripheral T-cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 769 – 779

Dreschler K, Bratke K, Petermann S, Bier A, Thamm P, Kuepper M, et al. Impact of immunotherapy on blood dendritic cells in patients with hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:487-494.

Dullaers M, De Bruyne R, Ramadani F, Gould HJ, Gevaert P, Lambrecht BN. The who, where, and when of IgE in allergic airway disease. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2012; 129: 635 – 645

Fanger NA, Voigtlaender D, Liu C, Swink S, Wardwell K, Fisher J, Graziano RF, Pfefferkorn LC, Guyre PM. Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 1997; 158: 3090 - 3098

Farrell E, O'Connor TM, Duong M, Watson RM, Strinich T, Gauvreau GM, O'Byrne PM. Circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells after allergen inhalation in asthmatic subjects. *Allergy.* 2007; 62: 1139 -1145

Flynn S, Toellner KM, Raykundalia C, Goodall M, Lane P. CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1. *J. Exp. Med.* 1998, 188: 297 – 304

Foster B, Metcalfe DD, Prussin C. Human dendritic cell 1 and dendritic cell 2 subsets express FcepsilonRI: correlation with serum IgE and allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 112: 1132 - 1138

Gill MA, Bajwa G, George TA, Dong CC, Dougherty II, Jiang N, Gan VN, Gruchalla RS. Counterregulation between the FcepsilonRI pathway and antiviral responses in human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 2012; 184: 5999 – 6006

Hadeiba H, Sato T, Habtezion A, Oderup C, Pan J, Butcher EC. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* 2008; 9: 1253 – 1260

Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 769 – 779

Heinrich J, Richter K, Frye C et al. Die europäische Studie zu Atemwegserkrankungen bei Erwachsenen [ European Community Respiratory Health Survey in Adults(ECRHS)]. *Pneumologie* 2002; 56: 297 – 303

Holt PG, Haining S, Nelson DJ, Sedgwick JD, origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. *J. Immunol.* 1994; 153: 256 – 261

Huang FP, Platt N, Wykes M, Major JR, Powell TJ, Jenkins CD, MacPherson GG. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* 2000; 191: 435 – 444

Ito T, Amakawa R, Inaba M et al. Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 Ligand and type I IFNs. *J. Immunol.* 2004; 172: 4253 – 4259

Ito T, et al. OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 13138 – 13143

Jahnsen FL, Moloney ED, Hogan T, Upham JW, Burke CM, Holt PG. Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge. *Thorax* 2001; 56: 823 – 826

Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 3388 – 3393

Jegalian AG, Facchetti F, Jaffe ES. Plasmacytoid dendritic cells: physiologic roles and pathologic states. *Adv. Anat. Pathol.* 2009; 16: 392 – 404

Johansson C, Tengvall Linder M, Aalberse RC, Scheynius A. Elevated levels of IgG and IgG4 to malassezia allergens in atopic eczema patients with IgE reactivity to malassezia. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 2004; 135: 93 – 100

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 863 – 869

Kadowaki N, Antonenko S, Lau J Y-N, Liu Y-N. Natural interferon- $\alpha/\beta$  producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp med* 2000; 192: 219-226

Kadowaki N, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp med* 2001; 194: 863 – 869

Kawamura K, Kadowaki N, Kitawaki T, Uchiyama T. Virus-stimulated plasmacytoid dendritic cells induce CD4<sup>+</sup> cytotoxic regulatory cells. *Blood* 2006; 107: 1031 – 1038

Kellersch B, Kolanus W. Membrane-proximal signaling events in beta-2 integrin activation. *Results Probl Cell Differ.* 2006; 43: 245 – 57.

Kitamura K, Takeda K, Koya T, Miyahara N, Kodama T, Dakhama A, et al. Critical role of the Fc $\gamma$ -chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J Immunol.* 2007; 178, 480 – 488

Kool M, van Nimwegen M, Willart AM, Muskens F, Boon L, Smit JJ, Coyle A, Clausen BE, Hoogsteden CH, Lambrecht BN, Hammad H. An Anti Inflammatory Role for Plasmacytoid Dendritic Cells in Allergic Airway Inflammation. *J. Immunol.* 2009; 183: 1074 – 1082

Lambrecht BN, Hammad H. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 994 – 1003

Lambrecht BN, De Veerman M, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Thielemans K, Pauwels RA. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 2000; 106: 551 – 559

Lambrecht BN, Salomon B, Klatzmann D, Pauwels RA, Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J. Immunol.* 1998; 160: 4090 – 4097

Lane SJ, Lee TH. Mast cell effector mechanisms. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996; 98: 67 – 72

Liu AH, Jaramillo R, Sicherer SH, Wood RA, Bock SA, Burks AW, Massing M, Cohn RD, Zeldin DC. National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010, 126:798 - 806

Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2003; 198: 513 – 520

Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. Recognition of single-stranded RNA virus by Toll-like receptor 7. *PNAS* 2004; 101:5598 - 5603

Ma DY, Clark EA. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin. Immunol.* 2009; 21: 265 - 72

Marakovsky E, Daro E, Roux E, Teepe C, Maliszewski CR, Hoek J, Caron D, Lebsack ME, McKenna HJ. In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 2000; 96: 878 – 884

Marakovsky E, Brasel K, Teepe M. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 1953 – 1962

Matsuda H, Suda T, Hashizume H et al. Alteration of balance between myeloid dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells in peripheral blood of patients with asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 166: 1050 – 1054

McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA, Holt PG, Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 1331 – 1336

Moller GM, Overbeek SE, Van Helden-Meeuwssen CG, Van Haarst JM, Prens EP, Mulder PG, Postma DS, Hoogsteden HC, Increased numbers of dendritic cells in the bronchial mucosa of atopic asthmatic patients: downregulation by inhaled corticosteroids. *Clin. Exp. Allergy* 1996; 26: 517 – 524

Mora JR, et al. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 2003; 424: 88 – 93

Morgan AJ, Guillen C, Symon FA, Huynh TT, Berry MA, Entwistle JJ, Briskin M, Pavord ID, Wardlaw AJ. Expression of CXCR6 and its ligand CXCL16 in the lung in health and disease. *Clin. Exp. Allergy.* 2005; 35: 1572 – 1580

Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ, Blazar BR, Chen W. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells. *J. Immunol.* 2004; 173: 4433 – 4442

Novak N, Allam JP, Hagemann T, Jenneck C, Laffer S, Valenta R, Kochan J, Bieber T. Charakterisation of FcεRI-bearing CD123<sup>+</sup> blood dendritic cell antigen-2<sup>+</sup> plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 114: 364 – 370

Nowak D, Volmer T, Wettengel R Asthma bronchiale - eine Krankheitskostenanalyse. *Pneumologie* 1996; 50: 364 – 371

O'Byrne PM, Dolovich J, Hargreave FE. Late asthmatic response. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 136: 740 – 751

Ogawa A, Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Takenaka M, et al. The differential role of L-selectin and ICAM-1 In the Th1-type and Th2-type contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 2010; 130: 1558 – 1570

Pan J, Ju D, Zhang M, Xia D, Zhang L, Yu H, Cao X. Dexamethasone inhibits the antigen presentation of dendritic cells in MHC class II pathway. *Immunol Lett* 2001; 76: 153 - 161.

Paolieri F, Battifora M, Riccio AM, Ciprandi G, Scordamaglia A, Morelli C, Bagnasco M, et. Al. Inhibition of adhesion molecules by budesonide on human epithelial cell line (lung carcinoma). *Allergy* 1997; 52: 935 – 943

Pulendran B, Smith JL, Caspary G, et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 1036 – 41

Punekar YS, Sheikh A. Establishing the sequential progression of multiple allergic diagnoses in a UK birth cohort using the General Practice Research Database. *Clin. Exp. Allergy.* 2009: 1889 – 1895

Qiu Y, Zhu J, Bandi V, Guntupalli KK, Jeffery PK. Bronchial mucosal inflammation and upregulation of CXC chemoattractants and receptors in severe exacerbations of asthma. *Thorax* 2007; 62: 475 – 482

Robays LJ, et al. Chemokine receptor CCR2 but not CCR5 or CCR6 mediates the increase in pulmonary dendritic cells during allergic airway inflammation. *J. Immunol.* 2007; 128: 5305 – 5311

Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C. Differentiation of T Regulatory Cells by Immature Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* 2001; 193: 5F – 10

- Sabatini F, Silvestri M, Sale R, Serpero L, Giuliani M, Scarso L, Favini P, et al. Concentration-dependent effects of mometasone furoate and dexamethasone on foetal lung fibroblas functions involved in airway inflammation and remodeling. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2003; 16: 287 - 297.
- Schroeder JT, Bieneman AP, Xiao H, Chichester KL, Vasagar K, Saini S, Liu MC. TLR9- and FcepsilonRI-mediated responses oppose one another in plasmacytoid dendritic cells by down-regulating receptor expression. *J. Immunol.* 2005; 175: 5724 - 5731
- Schröder JT, Chichester KL, Bienemann AP. Toll-like receptor 9 suppression in plasmacytoid dendritid cells after IgEdependent activation is mediated by autocrine TNF-alpha. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008; 121(2): 486 - 491
- Sertl K, Takemura T, Tschachler E, Ferrans VJ, Kaliner MA, Shevach EM. Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. *J. Exp. Med.* 1986; 163: 436 - 451
- Seth S, Oberdörfer L, Hyde R, Hoff K, Thies V, Worbs T, Schmitz S, Förster R. CCR7 essentially contributes to the homing of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes under steady-state as well as inflammatory conditions. *J. Immunol.* 2001; 186:3364 - 3372
- Shodell M, Siegal FP. Corticosteroids depress IFN-a-producing plasmacytoid dendritic cells in human blood. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 108: 446 - 448
- Siegal FP 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284: 1835 - 1837
- Spits H, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, Uittenbogaart CH. Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not pre-DC1: evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 1775 - 1784
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J. Exp. Med.* 1973; 137: 1142 - 116
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2003; 21: 685 - 711
- Stock S, Redaelli M, Wendland G, Civello D, Lauterbach KW. Asthma: prevalence and cost of illness. *Eur. Respir. J.* 2005; 25: 47 - 53
- Tversky JR, Le TV, Bienemann AP, Chichester KL, Hamilton RG, Schroeder JT. Human blood dendritic cells from allergic subjects have impaired capacity to produce interferon-alpha via toll-like-receptor 9. *Clin. Exp. Allergy.* 2008; 38: 781 - 788
- Uchida Y, Kurasawa K, Nakajima H, Nakagawa N, Tanabe E, Sueishi M, Saito Y, Iwamoto I. Increase of dendritic cells of type 2 (DC2) by altered response to IL-4 in atopic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 108:1005 - 1011



## Literaturverzeichnis

Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Aspod C, Cao T, Matsui T, DiPucchio T, Connolly J, Fay JW, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Re.* 2007; 219: 118 - 142

Upham JW, Denburg JA, O'Byrne PM. Rapid response of circulating myeloid dendritic cells to inhaled allergen in asthmatic subjects. *Clin. Exp. Allergy* 2002; 32: 818 – 823

Van Rijt LS, Lambrecht BN. Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization. *Clin. Exp. Allergy* 2005; 35: 1125 – 1134

Vermaelen KY, Carro-Muino I, Lambrecht BN, Pauwels RA. Specific migratory dendritic cells transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J. Exp. Med.* 2001; 193: 51 - 60

Vermaelen K, Pauwels R. Accelerated airway dendritic cell maturation, trafficking, and elimination in a mouse model of asthma. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 2003; 29: 405 – 409

Vermaelen K, Pauwels R. Pulmonary Dendritic Cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2005; 172: 530 – 551

Vijayanand P, Durkin K, Hartmann G, Morjara J, Seumois G, Staples KJ, et al. Chemokine receptor 4 plays a key role in T cell recruitment into the airways of asthmatic patients. *J Immunol* 2010; 184: 4568 – 4574.

Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kalinski P. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instructions, *J. Immunol.* 2000; 164: 4507 – 4512

Virchow JC JR. Bronchial asthma: extrinsic, intrinsic or mixed? *Wien. Med. Wochenschr.* 1996; 146: 415 - 418

Wendland M, Czeloth N, Mach N, Malissen B, Kremmer E, Pabst O, Förster R. CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104: 6347 - 6352

## **Publikation**

Bratke K, Prieschenk C, Garbe K, Kuepper M, Lommatzsch M, Virchow JC. Plasmacytoid dendritic cells in allergic asthma and the role of inhaled corticosteroid treatment. Clin Exp Allergy 2013; 43: 312-321

## Lebenslauf

Name: Christine Walburga Prieschenk

Geburtsdatum: 11.10.1983

Geburtsort: Tirschenreuth

Adresse: Andreasstr. 1, 93059 Regensburg

### Ausbildung

1990 – 1994 Grundschule Fuchsmühl

1994 – 2003 Otto-Hahn-Gymnasium Marktredwitz

27.06.2003: Allgemeine Hochschulreife

2003 – 2004 Studium der Chemie an der Universität Würzburg

2004 – 2006 Vorklinisches Studium der Medizin an der Universität Göttingen

2006 – 2010 Klinisches Studium der Medizin an der Universität Rostock

25.11.2010: Ärztliche Prüfung

2011 – 2012 Assistenzarztstelle für Innere Medizin und Pneumologie in der  
Klinik Donaustauf

2012 Assistenzarztstelle für Innere Medizin und Pneumologie in der  
Universitätsklinik Regensburg, Klinik für Innere Medizin II

## **Danksagung**

Ohne die Unterstützung meiner Eltern wäre mein Studium und damit auch diese Arbeit nur schwer möglich gewesen. Deshalb möchte ich mich bei ihnen ganz besonders bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. med. J. Chr. Virchow möchte ich mich für das hervorragende wissenschaftliche Umfeld bedanken, dass ich im Rahmen dieser Arbeit nutzen konnte.

Für die Hilfe bei der experimentellen Bearbeitung und Auswertung der Ergebnisse gilt mein Dank ganz speziell Herrn Dr. K. Bratke aber auch dem ganzen Laborteam das immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und verfasst habe. Ich habe keine Hilfsmittel außer den genannten verwendet.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Regensburg 22.07.2015

Christine Prieschenk

# **Charakterisierung zirkulierender plasmacytoider dendritischer Zellen bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale**

Von der medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Zentrum für Innere Medizin

Abteilung für Pneumologie/Interdisziplinäre Internistische Intensivtherapie

Direktor: Prof. Dr. med. J. Chr. Virchow, FRCP, FCCP, FAAAAI

## **Thesen zur Dissertation**

vorgelegt von

Christine Prieschenk

aus Regensburg

Rostock, 2013

Dekan Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

## Thesen

1. Im peripheren Blut von Patienten mit Asthma sind pDCs vermehrt vorhanden und am Ort einer allergischen Entzündung können pDCs in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden. Deshalb wird den pDCs eine wichtige Rolle an der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale zugeschrieben.
2. PDCs aus dem Blut von Atopikern und Nichtatopikern reagieren unterschiedlich auf die in-vitro Stimulation mit IL-4. Es wird deshalb postuliert, dass das beim Patienten mit Asthma vorherrschende Th2-Milieu zu phänotypischen und funktionellen Veränderungen der pDCs führt.
3. PDCs, die im Th2-Milieu eines Patienten mit Asthma differenzieren, befinden sich auch im symptomfreien Intervall auf einem höheren Aktivierungsniveau. Dies spiegelt sich in der vermehrten Expression von CD40, CD62L und TLR9 wider.
4. Das Muster der Chemokinrezeptoren ist auf den pDCs der Patienten mit Asthma derart verändert, dass sie rasch in entzündetes Gewebe auswandern können. Sie exprimieren vermehrt CCR2, CXCR2, CXCR5 und CXCR6, wodurch eine Migration in die Lunge vermittelt wird. Gleichzeitig exprimieren die pDCs der Patienten mit Asthma auch vermehrt die Chemokinrezeptoren CCR4, CCR9 und CCR10 die ein Auswandern in den Darm und die Haut bewirken.
5. Das Potential der pDCs der Patienten mit Asthma in die peripheren Lymphknoten zu emigrieren ist erniedrigt, was durch die seltenere Expression von CXCR3 und CCR7 zum Ausdruck kommt.
6. Durch die vermehrte Expression des IgG-Rezeptors CD64 und des IgE-Rezeptors FcεRIα verfügen die pDCs bei Patienten mit Asthma über ein erhöhtes Th2-stimulatorisches Potential und sind in der Lage eine chronische Entzündung zu unterhalten.

## Thesen

7. Inhalative Kortikosteroide verursachen systemische Langzeiteffekte, die auch acht Wochen nach der Therapie noch nachweisbar sind. PDCs von Patienten mit Asthma die mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt wurden exprimieren seltener CD54 und OX40L und verfügen nach Stimulation mit einem TLR9-Agonisten, über ein reduziertes sekretorisches Potential von IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und IL-6.